

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-504864

(43) 公表日 平成9年(1997)5月13日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	
G 0 1 N 33/543	5 2 1	0276-2J	G 0 1 N 33/543	5 2 1
B 0 1 L 3/00		9441-4D	B 0 1 L 3/00	
C 0 7 H 21/04		8615-4C	C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 Q 1/68	Z N A	9453-4B	C 1 2 Q 1/68	Z N A A
G 0 1 N 33/53		0276-2J	G 0 1 N 33/53	M

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-512803
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)10月27日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)4月26日
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/12282
 (87) 国際公開番号 WO95/11755
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)5月4日
 (31) 優先権主張番号 08/141, 969
 (32) 優先日 1993年10月28日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 ヒューストン・アドバンスド・リサーチ・センター
 アメリカ合衆国テキサス州77381、ザ・ウッドランズ、リサーチ・センター・ドライブ4800番
 (72) 発明者 ビーティー、ケネス・エル
 アメリカ合衆国テキサス州77381、ザ・ウッドランズ、ハリミード・ドライブ2番
 (74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

(54) 【発明の名称】 結合反応を別々に検出する微細加工フロースルー多孔性装置

(57) 【要約】

複数の別々かつ同時の結合反応を行うための改善された微細加工装置を記載する。該装置は、結合反応用の区別され離された部位をその上に位置する基板よりなる。該装置は、試験試料を基板に付した場合に、それが該結合反応の工程の間に各々のかかる領域を通して浸透できるよう、該基板を通して伸長しその第二表面で終結する区別され離された領域によって特徴付けられる。該装置は、DNA分子のハイブリダイゼーションによる配列決定に特に有用である。

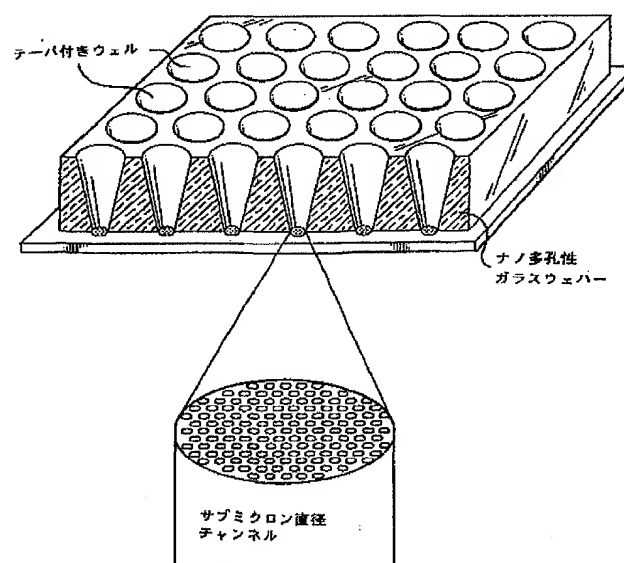


FIG. 1

【特許請求の範囲】

1.

(1)各区別され離された領域を同定しアドレスし、そこで結合反応が起こったか否かを測定し報告することができる検出手段と相互作用するか、または全体として相互作用するよう適合され、当該基板の表面にわたって配された複数の区別され離された領域を含む基板、および

(2)1またはそれを超える該区別され離された領域中の生体分子と試験試料との間の結合反応を検出することによって、該試験試料中の分子種を同定または特徴付けできる情報が得られるような、各区別され離された領域に固定された予め決定された構造の該生体分子の実質的に均一な試料

よりなる微細加工デバイスにおいて、

該基板との接触に際して該試験試料が該結合反応の工程の間を通して浸透することができるよう、該基板を通して伸長し、その第二表面で終止する区別され離された領域よりなる改良。

2. 該生体分子がオリゴヌクレオチドであって、該試験試料がポリ核酸よりなる請求項1記載の改良。

3. 該基板がナノ多孔性ガラスウェハーである請求項1記載の改良。

4. 該区別され離された領域が、該ナノ多孔性ガラスウェハーの一面に結合したテーパ付きウェルによりなる請求項3記載の改良。

5. 高密度アレイよりなり、ここに、該ナノ多孔性ガラスウェハー上の各区別され離された領域が約 $100\mu\text{m}$ の最大直径を有し、隣接する領域間の間隔が約 $500\mu\text{m}$ であり、該ウェハーが約 $100\mu\text{m}$ の厚さであり、それによって該ウェハー内の該円錐ウェルの容量が約 40nL であって、該ウェハー上の該領域の密度が約 $400\text{領域}/\text{cm}^2$ である請求項4記載の改良。

6. 超高密度アレイよりなり、ここに、該ナノ多孔性ガラスウェハー上の各区別され離された領域が約 $50\mu\text{m}$ の最大直径を有し、隣接する領域の間の間隔が

約 $150\mu\text{m}$ であり、該ウェハーが約 $50\mu\text{m}$ の厚さであり、それによってウェハー内の該円錐ウェルの容量が約 1nL であって、該ウェハー上の該領域の密度

が約4,400領域/ cm^2 である請求項4記載の改良。

7. アレイよりなり、ここに、該ナノ多孔性ガラスウェハー上の各区別され離された領域が約 $5\mu\text{m}$ ～約 $2000\mu\text{m}$ の最大直径を有し、隣接する領域間の間隔が該最大直径の約0.1～10倍であって、該ウェハーが約 $10\mu\text{m}$ ～約 $500\mu\text{m}$ の厚さである請求項4記載の改良。

8. 該基板が、ナノチャンネル・ガラスアレイまたは多孔性シリコンアレイよりなるウェハーである請求項1記載の超微細加工装置。

9. 該基板の第一表面を該試験試料で満たし、該第一表面に比して負の圧力下に該基板の該第二表面を置くことによって、該試験試料と該区別され離された領域との間で接触し、それによって生じる真空が該基板を通しての流動を促進する請求項1記載の改良。

10. 該ポリヌクレオチドの末端第一級アミン誘導体を、エポキシシランで誘導化したガラス基板に結合させることにより、該ポリヌクレオチドが該基板上の該区別され離された領域に固定化される請求項2記載の超微細加工装置。

11. 該ポリヌクレオチド-シラン固定が、1またはそれを超えるトリエチレングリコールホスホリル単位の取り込みよりなり、それによって該ガラス表面と該ポリヌクレオチドの塩基対との間の最適な間隔が達成される請求項10記載の改良。

12. 該オリゴヌクレオチドの末端ブロモアセチル誘導体を、ジチオアルカンで誘導体化した白金または金基板に結合させることによって、該オリゴヌクレオチドが該基板上の該区別され離された領域に固定化される請求項2記載の改良。

13. 該結合反応の検出が、荷電結合素子(CCD)を用いて放射性同位元素-、蛍光-または化学ルミネセンス-標識ポリ核酸のハイブリダイゼーションを検出することによる検出である請求項2記載の改良。

14.

(1)当該装置に剛直な支持体を提供する基板；

(2)該基板の表面にわたって配され、該基板の第二表面を通して伸長し、それによって該基板に孔を形成する区別され離された領域のアレイ；

(3) 1 またはそれを超える予め決定されたセットの生体分子が、そこを通る試験試料中の分子種と結合できるように、かかる試料が 1 またはそれを超える該領域に固定されている、予め決定されたセットの生体分子の実質的に均一な試料；および

(4) 結合反応が起こったか否かをかかる各領域につき検出し、その結果を報告することができる検出手段

よりなる、複数の結合反応を同時に行う微細加工デバイス。

15. さらに、ウェハーを通して流体流動を供する手段よりなる請求項 14 記載のデバイス。

16. 該予め決定されたセットの生体分子が 1 セットの完全に変性したオリゴヌクレオチド・プローブであって、該試験試料中の該分子種がポリ核酸である請求項 14 記載のデバイス。

17.

(1) 各区別され離された領域を同定しアドレスし、そこで結合反応が起こったか否かを測定し報告することができる検出手段と相互作用するか、または全体として相互反応するよう適合され、当該基板の表面にわたって配された複数の区別され離された領域を含む基板、

および

(2) 1 またはそれを超える該区別され離された領域中の生体分子と試験試料との間の結合反応を検出することによって、該試験試料中の分子種を同定または特徴付けできる情報が得られるような、各区別され離された領域に固定された予め決定された構造の該生体分子の実質的に均一な試料

よりなる試験試料中に含まれる分子種の同定のための微化デバイスを用いる方法において、

該領域を該基体を通して伸長させ、その第二表面で終止させるよう作製することによって、該結合反応の工程の間に該試験試料を該区別され離された領域を通

して浸透させることができることを特徴とする改良。

18. 該基板が、ナノチャンネル・ガラスアレイ、多孔性シリコンアレイまた

は剛直な合成ポリマーの架橋基盤よりなるウェハーである請求項17記載の改良

。

19. 該基板の第一表面を該試験試料で満たし、該第一表面に比して陰圧下に該基板の該第二表面を置くことによって、該試験試料と該区別され離された領域との間で接触させ、それによって真空が生じる請求項17記載の改良。

20. 該生体分子がオリゴヌクレオチドであって、該試験試料がポリ核酸よりなる請求項19記載の改良。

【発明の詳細な説明】**結合反応を別々に検出する微細加工フロースルー多孔性装置****発明の背景**

幾つかの形態のアレイドハイブリダイゼーション(arrayed hybridization)反応が、最近「ハイブリダイゼーションによる配列決定」(SBH)なる共通の課題下に関連されつつある。これには、異なるオリゴヌクレオチド・プローブと膜上に格子状配列されたDNA試料のアレイとの段階的なハイブリダイゼーションを含む「フォーマット1」バージョンのSBH、ならびに、平面表面につなぎ留められたか、または薄ゲルマトリックス内に固定化されたオリゴヌクレオチド・プローブのアレイへの単一核酸「標的配列」のハイブリダイゼーションを含む「フォーマット2」の実行が含まれる。「ジェノセンサー(genosensor)」なる語は、今まで、その中で二次元アレイの表面にオリゴヌクレオチドがつなぎ留め、核酸「標的」配列中に存在する相補配列の認識素子として供されるSBHの形態をいつてきた。さらに、ジェノセンサー概念には、アレイを横切るハイブリダイゼーションを迅速、かつアドレス可能に検出することができる、各試験部位に微細電子部品が存在する微細加工装置が含まれる。

本発明により、新規なフロースルー・ジェノセンサーが提供され、そこでは、固形支持材料のウェハーにわたり斑点状に配された、密充填された孔またはチャンネル内に核酸認識素子が固定化されている。支持ウェハーとして有用なマイクロチャンネルまたはナノチャンネルのガラスおよび多孔性シリコンの製造には、公知の微細加工技術を利用できる。フロースルー・ジェノセンサーは、微細加工された光学および電子工学検出部品、フィルム、荷電結合素子アレイ、カメラシステムおよびりん光貯蔵技術を包含する種々の慣用的な検出方法を利用している。

本明細書の新規なフロースルー装置については、公知の平面表面設計に比して以下の利点が得られる：

(1)断面積当たりの核酸結合量を増加させる表面積が膨大に増大したことにより、検出感度が改善され；

(2)ハイブリダイゼーション反応に先立つ拡散律速工程が最小化され(平均標的分子が表面につなぎ留められたプローブに出くわすのに要する時間が数時間から数ミリ秒に短縮され)、ハイブリダイゼーションがスピード化され、順反応および逆反応の両方において誤対合識別ができ；

(3)多孔性ウェハーを通して溶液を徐々に流動できるため、希薄な核酸溶液を分析することができ；

(4)ハイブリダイゼーション・アレイ内の特異的部位にプローブをデリバリーすることを含む、ハイブリダイゼーションの続くラウンドが促進され；

(5)回収分子のさらなる分析ができるアレイ内の特異的ハイブリダイゼーション部位から結合した核酸のかかる回収が促進され；かつ

(6)大気に暴される平面表面上のプローブ溶液の小液滴が迅速に乾燥するのが避けられることにより、各分離領域内の表面にプローブ分子が化学結合するのが促進される。

従って、本発明により、

—基板上で複数の結合反応を同時に行うための装置および方法であって、

—該基板は該基板上の区別され離された領域のセットよりなる微細加工デバイスであり、

—各かかる区別され離された領域はかかる結合反応の位置に対応するようにされ、

—ここに、各かかる区別され離された領域はかかる境界領域に固定された区別される化学構造の生体分子の実質的に均一な試料を含有し、

—該基板と試料および1以上の所望の生体分子と制御可能に結合できる1以上の分子種を含有する試料（以下、「試験試料」という）との間の接触に際し、

かかる結合が起こる境界領域の検出が試験試料の分子種を特徴付けまたは同定できる結合パターンを生じるようにされた、改良された装置および方法を提供する。

本発明は、特に、結合反応を行い検出する、新規の高密度および超高密度の微細加工された多孔性デバイスを提供する。特に、本発明は、改善された「ジェノ

センサー」、ならびに特徴付けされていないポリ核酸、例えば、cDNA、mRNA、組換えDNA、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)断片等、および他の生体高分子を含有する試料との核酸プローブ・ハイブリダイゼーションを介した核酸配列の同定または特徴付けにおけるその使用方法を提供する。

過去十年間に、微細加工技術は、電子産業を革命し、多数の産業における製造プロセスの小型化および自動化を可能としてきた。生物医学的研究における微細加工技術の影響は、マイクロプロセッサに制御された分析器具およびロボット工学が研究室内、特に高処理量の染色体地図作成および配列決定に従事する研究室内でますます増えていくことに認めることができる。ヒト・ゲノム・プロジェクトは、染色体地図作成および配列決定に広く適用できる微細加工された高密度および超高密度のハイブリダイゼーション装置からその経済性が多大な利益を受けるであろう業務の主な例である。

膜-固定化DNAと標識DNAプローブとのハイブリダイゼーションは、染色体地図作成に広く用いられる分析方法である。最近では、ロボット工学装置により、10,000-15,000の異なる標的DNAを12cm×8cmの膜上に基盤状に固定することが可能である(ベンター, ジェイ・シイ(Venter, J. C.))(編者)中のダーマナク, アール(Drmanac, R.)、ダーマナク, エス(Drmanac, S.)、ジャービス, ジェイ(Jarvis, J.)およびラバット, アイ(Labat, I.)、1993年、「自動化DNA配列決定および分析技術(Automated DNA Sequencing and Analysis Techniques)」アカデミック・プレス(Academic Press)社、印刷中、ならびにメイアー-エバート, エス(Meier-Ewert, S.)、マイアー, イー(Maier, E.)、アマディ, エイ(Ahmadi, A.)、カーティス, ジェイ(Curtis, J.)およびレーラッチ, エイチ(Lehrach, H.)1993年、サイエンス(Science)第361巻: 375-376頁)。かかるフィルターへのDNAプローブのハイブリダイゼーションは、線状に整列されたライブラリーの生成、クローン化したゲノムセグメントの特異的な染色体またはメガYACへの地図作成、cDNAおよびゲノム

ムライブラリーにおけるクローン化配列の異種結合、他を包含するゲノム地図作

成において膨大な適用を有する。「ハイブリダイゼーションによる配列決定(SBH)」における最近の主導は、小型化され高密度のハイブリダイゼーション・アレイを標的にしている。ハイブリダイゼーション・アレイを膜中または平面表面上に小型化することの重大な制限は、(二次元表面上では)表面積の関数である、単位断面積当たりのDNA量である。この指標はハイブリダイズしたDNA収量を支配し、それ故、検出感度も支配する。

最近、ジェノセンサー、または小型化「DNAチップ」が、DNA試料のハイブリダイゼーション分析のために、幾つかの研究室で開発されている。DNAチップは、典型的に、平面表面につなぎ留められたDNAプローブのアレイを用いて、標的DNAのヌクレオチド配列を反映するハイブリダイゼーション・パターンを得る(例えば、フォドール, エス・ピー・エイ(Fodor, S. P. A.)、リード, ジェイ・エル(Read, J. L.)、ピルング, エム・シイ(Pirrung, M. C.)、ストリエル, エル(Stryer, L.)、ル, エイ・ティー(Lu, A. T.)、およびソラス, ディー(Solas, D.)、1991年、サイエンス(Science)第251巻: 767-773頁、サザン, イー・エム(Southern, E. M.)、マスコス, ユウ(Maskos, U.)およびエルダー, ジェイ・ケイ(Elder, J. K.)、1992年、ジェノミクス(Genomics)第13巻: 1008-1017頁、エッグァーズ, エム・ディー(Eggars, M. D.)、ホーガン, エム・イー(Hogan, M. E.)、レイ, アール・ケイ(Reigh, R. K.)、ラムチャー, ジェイ・バイ(Lamture, J. B.)、ビーティー, ケイ・エル(Beattie, K. L.)、ホルス, エム・エイ(Hollis, M. A.)、アーリッヒ, ディー・ジェイ(Ehrlich, D. J.)、コシツキ, ビイ・バイ(Kosicki, B. B.)、シューメーカー, ジェイ・エム(Shumaker, J. M.)、バルマ, アール・エス(Varma, R. S.)、バーク, ビイ・イー(Burke, B. E.)、マーフィー, エイ(Murphy, A.)およびラスマン, ディー・ディー(Rathman, D. D.) 1993年、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)第39巻: 719-722頁)。膜ハイブリダイゼーションにおけるごとく、平面表面ジェノセンサー上のハイブリダイゼーションの検出限界は、二次元の領域に結合させることができるDNAの量によって制限される。

これらの先行技術アプローチのもう1つの制限は、平面表面設計によりハイブ

リダイゼーション反応に律速工程が導入される、すなわち、表面上の相補的プローブに出くわす前に比較的長い距離にわたって標的分子が拡散するという事実である。それとは反対に、本発明による微細加工装置は、平面表面ハイブリダイゼーションにおける拡散律速工程を排し、DNAの断面積密度を増大し、現行の固相ハイブリダイゼーション材料の生来の制限が克服されるよう設計されている。

典型的には、微細加工ジェノセンサー装置は、コンパクトな物理学的サイズおよびそれに設置された素子の密度によって特徴付けられる。公知の微細加工結合装置は、典型的には、約 1 cm^2 の表面積、すなわち $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ を有する方形ウェハー型装置である。かかる装置上の結合領域は、重要な目的に関してはより高い密度を有する装置を構築するのが望ましいが、典型的には、 $10^2\text{--}10^4$ 領域/ cm^2 の密度で存在する(エッガーズ(Eggers)およびビーティー(Beattie)、結合領域用のより高い密度を有する装置の構築に関する戦略の議論に関する前掲を参照)。

本明細書中に記載する微細加工装置は、ハイブリダイゼーションによる核酸配列分析(SBH)、遺伝子-特異的プローブのアレイに対する細胞性mRNAのハイブリダイゼーションによる遺伝子発現型の分析、蛋白質混合物の免疫化学的分析、エピトープ・マッピング、受容体-リガンド相互作用のアッセイ、ならびに、個々の結合部位内に固定化された特異的リガンドまたは受容体に対する細胞表面分子の結合に関与する細胞集団の特徴付けを包含する、種々の分析業務に有用であることが知られている。核酸分析はかかる超微細装置の1つの主な使用であるが、それは、小分子、高分子、粒子および細胞系を包含する広範な分子結合反応に有利に適用できる(例えば、PCT国際公開番号WO 89/10977号に記載されている使用を参照)。

通常、該微細加工装置は、結合が起きた結合領域と結合が起きなかった領域との間を識別するのに特に適用され、異なる結合領域における結合の相対的程度を定量化するための公知の検出技術と結合して用いられる。DNAおよびRNA配列の検出においては、オートラジオグラフィーおよび光学的検出が有利に用いら

れる。オートラジオグラフィーは ^{32}P または ^{35}S 標識試料を用いて行う。慣用的

なDNA配列分析の適用には、核酸断片を ^{32}P で末端標識し、これらの末端-標識断片をサイズによって分離し、次いで、x-線フィルムの領域に隣接する放射エネルギーの関数として、当該フィルムを露光するのに必要なようにx-線フィルムに隣接して置く。別法として、ホスホリメジャー(phosphorimager)検出法を用いることもできる。

蛍光-標識受容体の光学的検出も検出に用いられる。慣用的な配列決定においては、DNA塩基-特異的蛍光色素を、DNAポリメラーゼと結合させて用いるオリゴヌクレオチド・プライマーまたは鎖-終止ジデオキシヌクレオチドに共有結合する。各色素の適当な吸収波長を選択し、それを用いて色素を励起させる。色素の吸収スペクトルが互いに接近する場合には、特異的波長を選択し、全体セットの色素を励起することができる。1つの特に有用な光学検出技術には、二重らせん核酸を染色する臭化エチジウムの使用が含まれる。これらの色素の蛍光性は、それが二重らせん化DNAまたはRNAに結合した場合には、非結合色素または一本鎖DNAに結合した色素によって示される蛍光と比較した場合、約20倍の増大を示す。この色素を有利に用いて、ハイブリダイズポリ核酸の存在を検出する。

非常に好ましい検出方法は、電荷結合素子アレイまたはCCDアレイである。CCDアレイでは、該CCDアレイ内の個々の画素または画素群が、検出が行われる基板の各区画領域に隣接して設置されている。ハイブリダイズした分子を有する試験部位における照明光(illuminating light)のより大きな吸収によって引き起こされる光減衰を用いて、ハイブリダイゼーションが起こった部位が決定される。レンズベースのCCDカメラも用いることができる。

別法として、ACコンダクタンスの変化を感知するよう検出装置を作製することができ、あるいは各区画領域に連続して設置したコンデンサーの消散を測定することができる。同様に、各区画領域に連続する2本の電極間に伝達配線を形成することによって、ラジオ周波数(RF)損失によりハイブリダイズした分子を測定することができる。本明細書で用いる好ましい方法は、(出典明示して本

明細書の一部とみなす) 1993年11月11日に公開されたPCT国際公開番号WO 93/22678号「分子検出用の光学的および電子工学的な方法および装置(Optical and Electrical Methods and Apparatus for Molecule Detection)」に記載されている。

予め決定した構造の実質的に均一な生体分子の試料を超微細装置の区画領域に結合させる方法も同様に知られている。そのように行う1つの好ましい方法は、ガラスまたは金フィルムのごとき表面にこれらの生体分子を共有結合させることである。例えば、オリゴヌクレオチド・プローブをガラス表面に結合させる方法が知られている。その化学合成の間に、1つの末端に第一級アミンを導入する。所望により、1またはそれを超えるトリエチレングリコール単位をスペーサー単位としてその間に導入することもできる。エポキシシランで区画領域中のガラス表面を誘導化した後、オリゴヌクレオチドの第一級アミン末端がそこに共有結合できる。

微細加工装置の結合領域中に予め決定された生体分子を固定化するこの技術のさらなる記載は、ビーティー(Beattie)ら、前掲を参照せよ。

関連技術

クラプコ, ケイ・アール(Khrapko, K. R.)ら、「オリゴヌクレオチド基盤とのハイブリダイゼーションによりDNA配列決定する方法(A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix)」ジャーナル・オブ・ディーエヌエイ・シーケンシング・アンド・マッピング(J. DNA Sequencing and Mapping)第1巻: 375-388頁(1991年)、ダーマナク(Drmanac), ラドジェ(Radoje)ら、「ハイブリダイゼーションによる配列決定: 膜上にアレイされた百万個のM13クローンの自動配列決定に向けて(Sequencing by hybridization: Towards an automated sequencing of one million M13 clones arrayed on membranes)」エレクトロフォーシス(Electrophoresis)第13巻: 566-573頁(1992年)、メイアー-エバート(Meier-Ewert)、セバスチャン(Sebastian)「発現された配列カタログを生成させる自動化アプローチ

チ(An automated approach to generating expressed sequence catalogues)」

ネイチャー(Nature)第361巻: 375-376頁(1993年)、ダーマナク、アール(Drmanac, R.)ら、「ハイブリダイゼーションによるDNA配列決定: 効率的な長いスケールの配列決定の戦略(DNA Sequence Determination by Hybridization: A Strategy for Efficient Large-Scale Sequencing)」サイエンス(Science)第260巻: 1649-1652頁(1993年)、サザン、イー・エム(Southern, E.M.)ら、「オリゴヌクレオチド・アレイへのハイブリダイゼーションによる核酸配列の分析および比較: 実験モデルを用いた評価(Analyzing and Comparing Nucleic Acid Sequences by Hybridization to Arrays of Oligonucleotides: Evaluation Using Experimental Models)」ジェノミクス(Genomics)第13巻: 1008-1017頁(1992年)、ならびにサイキ(Saiki)、ランドール・ケイ(Randall K.)ら、「固定化配列-特異的オリゴヌクレオチド・プローブでの増幅DNAの遺伝解析(Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes)」プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・イン・ユウエスエイ(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)第86巻: 6230-6234頁(1989年)は、基盤または基板に結合させたオリゴヌクレオチドのアレイの使用を介することを含む、ハイブリダイゼーションによる配列決定を記載している。エッガーズ、ミッチェル・ディー(Eggers, Mitchell D.)ら、「ジェノセンサー: 自動化DNA配列分析用の微細加工装置(Genosensors: microfabricated devices for automated DNA sequence analysis)」1993年1月21日、ジ・インターナショナル・ソサイエティー・フォー・オブティカル・エンジニアリング、プロシーディングズ・プレプリント、アドバンシーズ・イン・ディーエヌエイ・シーケンス・テクノロジー、SPIE・プロシーディングズ・シリーズ(SPIE Proceedings Series, Advances in DNA Sequence Technology, Proceedings Preprint, The International Society for Optical Engineering); ビーティー, ケネス(Beattie, Kenneth)ら、「ジェノセンサー・テクノロジー(Genosensor Technology)」クリニカル・ケミストリー

(Clinical Chemistry)第39巻: 719-722頁(1993年); ラムチャー

、ジェイ・ビー(Lamture, J. B.)ら、「電荷結合素子表面上の核酸ハイブリダイゼーションの直接的検出(Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device)」ヌクレック・アシズ・リサーチ(Nucl. Acids Res.)第22巻: 2121-2124頁(1994年); ならびにエッガーズ, エム(Eggers, M.)ら、「ルミネセンスおよび放射性同位元素レポーターを用いて分子を定量的に検出するマイクロチップ(A microchip for quantitative detection of molecules utilizing luminescent and radio-isotope reporter groups)」バイオテクニクス(Biotechniques)第17巻: 516-525頁(1994年)は、DNA用のハイブリダイゼーションによる配列決定(SBH)に有用な微細加工装置を設計する一般戦略および方法論を記載している。

発明の概要

本発明は、特に：

(a)

(1)各区別され離された領域を同定しアドレスし、そこで結合反応が起こったか否かを測定し報告することができる検出手段と相互反応するか、または全体として相互反応するよう適合され、当該基板の表面にわたって配された複数の区別され離された領域を含む基板、および

(2)1またはそれを超える該区別され離された領域中の生体分子と試験試料との間の結合反応を検出することによって、該試験試料中の分子種を同定または特徴付けできる情報が得られるような、各区別され離された領域に固定された予め決定された構造の該生体分子の実質的に均一な試料

よりなる微細加工デバイスにおいて、

該基板との接触に際して該試験試料が該結合反応の工程の間を通して浸透することができるよう、該基板を通して伸長し、その第二表面で終止する該区別され離された領域よりなる改良、

(b)該生体分子がオリゴヌクレオチドであって、該試験試料がポリ核酸よりなる上記改良、

(c)該基板がナノ多孔性ガラスウェハーである上記改良、

(d)該区別され離された領域が、該ナノ多孔性ガラスウェハーの一面に結合したテーパ付円錐ウェルによりなる上記改良、

(e)高密度アレイよりなり、ここに、該ナノ多孔性ガラスウェハー上の各区別され離された領域が約 $100\mu\text{m}$ の最大直径を有し、隣接する領域間の間隔が約 $500\mu\text{m}$ であり、該ウェハーが約 $100\mu\text{m}$ の厚さであり、それによって該ウェハー内の該円錐ウェルの容量が約 40nL であって、該ウェハー上の該領域の密度が約 $400\text{領域}/\text{cm}^2$ である上記改良、

(f)超高密度アレイよりなり、ここに、該ナノ多孔性ガラスウェハー上の各区別され離された領域が約 $50\mu\text{m}$ の最大直径を有し、隣接する領域の間の間隔が約 $150\mu\text{m}$ であり、該ウェハーが約 $50\mu\text{m}$ の厚さであり、それによってウェハーの該円錐ウェルの容量が約 1nL であって、該ウェハー上の該領域の密度が約 $4,400\text{領域}/\text{cm}^2$ である上記改良、

(g)アレイよりなり、ここに、該ナノ多孔性ガラスウェハー上の各区別され離された領域が約 $5\mu\text{m}$ ～約 $2000\mu\text{m}$ の最大直径を有し、隣接する領域間の間隔が該最大直径の約 $0.1\sim 10$ 倍であって、該ウェハーが約 $10\mu\text{m}$ ～約 $500\mu\text{m}$ の厚さである上記改良、

(h)該基板の第一表面を該試験試料で満たし、該第一表面に比して負の圧力下に該基板の該第二表面を置くことによって、該試験試料と該区別され離された領域との間で接触し、それによって生じる真空が該基板を通しての流動を促進する上記改良、

(i)該ポリヌクレオチドの末端第一級アミン誘導体を、エポキシシランで誘導体化したガラス基板に結合させることにより、該ポリヌクレオチドが該基板上の該区別され離された領域に固定化される上記改良、

(j)該ポリヌクレオチド-シラン固定が、1またはそれを超えるトリエチレングリコールホスホリル単位の取り込みよりなり、それによって該ガラス表面と該

ポリヌクレオチドの塩基対との間の最適な間隔が達成される上記改良、

(k)該オリゴヌクレオチドの末端ブロモアセチル誘導体を、ジチオアルカンで

誘導化した白金または金基板に結合させることによって、該オリゴヌクレオチドが該基板上の該区別され離された領域に固定化される上記改良、

(1)該結合反応の検出が、荷電結合素子(CCD)を用いて放射性同位元素-、蛍光-または化学ルミネセンス-標識ポリ核酸のハイブリダイゼーションを検出することによる検出である上記改良、

(m)

(1)当該装置に剛直な支持体を提供する基板；

(2)該基板の表面にわたって配され、該基板の第二表面を通して伸長し、それによって該基板に孔を形成する区別され離された領域のアレイ；

(3)1またはそれを超える予め決定されたセットの生体分子が、そこを通る試験試料中の分子種と結合できるように、かかる試料が1またはそれを超える該領域に固定されている、予め決定されたセットの生体分子の実質的に均一な試料；
および

(4)結合反応が起こったか否かをかかる各領域につき検出し、その結果を報告することができる検出手段

よりなる、複数の結合反応を同時に行う微細加工デバイス。

(n)さらに、ウェハーを通して流体流動を提供する手段よりなる上記デバイス。

(o)

(1)各区別され離された領域を同定しアドレスし、そこで結合反応が起こったか否かを測定し報告することができる検出手段と相互作用するか、または全体として相互反応するよう適合され、当該基板の表面にわたって配された複数の区別され離された領域を含む基板、および

(2)1またはそれを超える該区別され離された領域中の生体分子と試験試料との間の結合反応を検出することによって、該試験試料中の分子種を同定または特徴付けできる情報が得られるような、各区別され離された領域に固定された予め決定された構造の該生体分子の実質的に均一な試料

よりなる試験試料中に含まれる分子種の同定のための微化デバイスを用いる方法において、

該領域を該基体を通して伸長させ、その第二表面で終止させるよう作製することによって、該結合反応の工程の間に該試験試料を該区別され離された領域を通して浸透させることができることを特徴とする改良、を提供する。

本発明の装置を用いて、同様の方法で、かつ当該分野で知られている同一の結合様式を用いて、生体分子に制御可能に結合できる分子種が特徴付けられ、または他の方法で同定される。これらの新規な装置の使用には、抗体-抗原およびリガンド-受容体結合が含まれるが、本発明の主な使用は核酸配列分析の分野である。DNAの2つの基本的な特性は、細胞中におけるその暗号に極めて重要であることおよび複製機能である：

(1) DNA鎖に沿った特異的配列中の「塩基」[アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)およびチミン(T)]の配置によって、個々の遺伝構造が決定される。DNA配列の相違は、種間および生ずる種の異なる固体間の身体的な特徴における相違の原因となり、

(2) DNAの1つの鎖はもう1つのDNA鎖と特異的に対合して二本鎖構造を形成することができ、そこで、塩基は特異的な水素結合によって対合する：AはTと対合し、GはCと対合する。特異的な対合は、DNAともう1種の核酸、すなわちリボ核酸(RNA)との間でも起き、そこで、RNA中のウラシル(U)はDNAにおけるTと同一の塩基対合特性を示す。

塩基対合の特異的パターン(AとTまたはU、GとC)は、細胞中の核酸の適切な機能に極めて重大であり、細胞外の核酸配列の分析の非常に特異的な手段もなす。特異的塩基配列の核酸鎖は、核酸試料中の完全に「相補的な」配列の存在のための、「プローブ」に対する配列認識素子として用いることができる(コナー(Conner)ら、*プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・イン・ユウエスエイ* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 第80巻: 278-282頁(1983年))。かくして、DNAまたはRNAの試料が特異的

塩基配列を含有する核酸「プローブ」と「アニーリング」または「ハイブリダイズ」する場合には、該プローブと標的との間に完全な(または完全に近い)配列相

補性が存在する場合にのみ、該プローブは核酸「標的」鎖に結合するであろう。核酸試料中の特異的塩基配列の存在を示すハイブリダイゼーション事象は、典型的には、核酸試料またはプローブを表面上に固定化し、続いて相補鎖によって運搬される「標識」（例えば、放射能または蛍光）を捕捉することによって検出される。

DNAハイブリダイゼーションを用いてDNA試料間の配列同一性または相違性が探索されており、例えば、特異的遺伝子領域内の突然変異の検出に用いられている(キッド(Kidd)ら、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(N. Engl. J. Med.)第310巻: 639-642頁(1984年); サイキ(Saiki)ら、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(N. Engl. J. Med.)第319巻: 537-541頁(1988年); サイキ(Saiki)ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・イン・ユウエスエイ(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)第86巻: 6230-6234頁(1989年))。DNAプローブ分析は遺伝病に関連する突然変異の検出には有用な手段ではあるが、現在の方法は、各突然変異の検出につき別々のハイブリダイゼーション反応を行う必要性により制限されている。多くのヒト遺伝病、例えば、ガン(ホールシュタイン(Hollstein)ら、サイエンス(Science)第253巻: 49-53頁(1991年))は、影響する遺伝子内の多くの位置に分布する多数の突然変異のいずれかと関連している。これらの場合においては、困難なDNA配列決定法を用いて疾病-関連突然変異を同定することが必要であった。個人の集団を含む多数のDNA試料を分析する必要がある場合には、問題は複雑となる。遺伝子毒性化学物質または放射能への暴露により誘導される突然変異を検出することは、毒物学試験および集団スクリーニングにおける目標であるが、再度、かかる突然変異分析には困難で、費用および時間がかかる手法が現在必要である。

遺伝病に加えて、突然変異は集団の個々のメンバー間のDNA配列の多形性の原因でもある。遺伝子の多形性とは、集団内の個人の重要な画分に保存されてい

るいずれかの供された遺伝子座におけるDNA配列の変化である。検出可能なDNA配列の変化が発現型マーカーに密接にリンクし、集団内の少なくとも5%の

個人の頻度で生じている場合には、DNA配列の多形性は遺伝子地図の作成において有用なマーカーとして供することができる。加えて、多形性は、法廷の同定および実父確定検査に用いられている。遺伝子多形性の検出に最近用いられている方法には、任意の配列のオリゴヌクレオチド・プライマーを用いるDNA増幅法(ウィリアムス(Williams)ら、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucl. Acids Res.)第18巻: 6531-6535頁(1991年); ウェルシュ(Welsh)およびマックルランド(McClelland)、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucl. Acids Res.)第18巻: 7213-7218頁(1991年))と結合した、「制限多形」(RFLPS)(ランダー(Lander)およびボットシュタイン(Bottstein)プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・イン・ユウエスエイ(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)第83巻: 7353-7357頁(1986年))、ゲル電気泳動DNA長分析の同様な困難な研究、ならびにゲノムDNAの種々の長さの短鎖の縦列反復配列のゲル電気泳動分析が含まれる(ウェーバー, ジェームス・エル(Weber, James L.)ジェノミクス(Genomics)第7巻: 524-530頁(1990年)およびウェーバー, ジェームス・エル(Weber, James L.), アメリカン・ジャーナル・オブ・ヒューマン・ジェネティクス(Am. J. Hum. Genet.)第44巻: 388-396頁(1989年))。

もう1つの種類のDNA配列変形は、生物種の間で生じるものであり、これは幾つかの理由により重要である。第一に、種間の配列の相違の同定により、種間の発現型の相違の分子基礎の決定を補助することができる。第二に、膨大な関連種の中の特異的遺伝子内の配列変形を調べることにより、該遺伝子によりコードされる蛋白質産物内の許容できるアミノ酸置換のスペクトルが解明され、この情報は、構造-機能相関の決定および蛋白質エンジニアリング・プログラムに価値がある。しかしながら、現在のDNA配列決定の方法によって行う場合には、このタイプの標的化DNA配列の比較は、極めて困難で、時間を消費し、費用がかかる。加えて、遺伝子配列変形は、生物、例えば、感染性の微生物の特異的同定の基礎をなし得る。

本発明の装置は、ハイブリダイゼーションによる核酸配列分析、遺伝子-特異

的プローブへの細胞性mRNAのハイブリダイゼーションによる遺伝子発現パターンの分析、蛋白質混合物の免疫化学分析、エピトープ・マッピング、受容体-リガンド相互作用のアッセイ、ならびに個々の結合部位内に固定化された特異的リガンドまたは受容体への細胞表面分子の結合を含む細胞集団の特徴付けを包含する、種々の分析業務に用いられる。核酸分析を本開示にて特に教示したが、本発明は、小分子、高分子、粒子および細胞系を含む広範な分子結合反応に等しく適用することができる。

図面の簡単な説明

図1は、そこに固定した生体分子の結合領域を構成する0.1-10 μ m直径のチャンネルを含む多孔性ウェハーの剛直な支持部材よりなるテーパ付き試料ウェルアレイの使用を図示している。以下に記載するごとく、該結合領域は上部重合層が結合したマイクロ多孔性またはナノ多孔性のガラスウェハーである。

図2は、多孔性基板の上部表面と接触する上部貯蔵器に付した物質が試料ウェルを通して流動するように、真空を付することができる密閉下部チャンバー中のウェハー基板のパッケージングを図示している。特に図2に図示するのは、ウェハー下部チャンバーの密封をなすデルリン(Derlin)O-リングの使用である。

図3は、集積試料ウェルを有する多孔性シリコンウェハーを図示している。図示した装置を作製する方法は実施例3に記載する。

図4は、さらなる任意の圧縮上部チャンバーを有する図2と同一の真空含有ウェハー下部チャンバー装置を図示している。再度、図示するごとく、上部チャンバーはデルリンO-リングを使用することによって密閉される。

図5は、本発明による装置でのhprt突然変異検出アッセイの結果の理想化した模式図を供している。図の左側に示した配列は、配列番号：2のヌクレオチド23-55に相当する。図の右側の2つの配列の内の1つは、配列番号：4のヌクレオチド3-22(左側から16番目のポジションにAを有する配列)に相当

し、もう1つは配列番号：5のヌクレオチド3-22(ポジション16でAがGに置換した下線の配列)に相当する。

図6は、異なる実験条件下で遺伝子発現の特徴付けを行ったハイブリダイゼー

ション・アッセイの理想化した模式図を供している。該アッセイ方法の詳細は、実施例11に供する。

詳細な説明

本発明は以下の好ましい具体例を介してより簡単に理解される：

実施例1：ナノチャンネルガラス(NCG)ウェハー

高表面積ナノ多孔性支持体構造物としてナーバル・リサーチ研究所(Naval Research Laboratory)で開発された、2タイプのナノチャンネル・ガラスアレイを用い、ハイブリダイゼーション用のDNA標的またはプローブをつなぎ留めた。NCG材料は、直径で33nm程小さいか、または直径で数 μ m程大きな平行の孔またはチャンネルの規則的な幾何学的アレイを含むユニークなガラス構造物である(トヌッチ, アール・ジェイ(Tonucci, R. J.)、ジャスタス, ビイ・エル(Justus, B. L.)、カンピロ, エイ・ジェイ(Campillo, A. J.)およびフォード, シイ・イー(Ford, C. E.)、1992年、サイエンス(Science)第258巻：783-785頁参照)。これらのナノチャンネル・ガラス構造物は、種々のアレイ立体構造で作製された、1cm²当たり 3×10^{10} チャンネルを超える充填密度を有することができる。種々の物質をNCGアレイのチャンネル内のガラス表面に固定化するか、またはつなぎ留めて、容量比に対して高表面積を得ることができる。

ナノチャンネル・ガラスアレイは、少なくとも1種のガラスタイプが通常は酸エッチング可能である、予め決定した立体構造で似ていないガラスを配列することによって作製する。2次元六方密充填アレイの作製は、円筒状の酸エッチング可能なガラス・ロッド(チャンネル・ガラスという)を、その内径がロッドのものと適合する不活性ガラス管(基盤ガラスという)に挿入することによって開始する。

次いで、真空下にてその組合せを引延ばして、細フィラメントの横断面に対する全横断面を減少させる。次いで、該フィラメントを積み重ね、再融合させ、再度引延ばす。適当なチャンネル直径および所望の数のアレイ素子が達成されるまでこのプロセスを続ける。不活性ガラス管の外側寸法のものに対するエッチング可

能なガラスロッドの直径の比を調節することにより、ロッドの中心-中心の間隔、ならびに最終産物のその直径が、独立して調節可能な指標となる。

作製プロセスが完了したら、ダイヤモンド磨きでチャンネルの向きに対して垂直にNCG材料を封じ、次いで、研磨して0.1-1.0 mm区画の材料を作製する。次いで、アレイ構造のチャンネルガラスを酸溶液でエッチングし、取り除く。

チャンネルガラスの六方密充填配列は、酸エッチングした後、典型的には10⁷チャンネルを含有し、全体的に均質である。チャンネル直径は、典型的には450 nmで、中心-中心の間隔は約750 nmである。前記のタイプのアレイ構造は、本発明によるNCGアレイ・ハイブリダイゼーション・アセンブリーに有用である。この立体構造では、テーパ付き試料ウェル構造が特異的ハイブリダイゼーション試験部位として供される各群のチャンネルを区画している。

作製プロセスの間にチャンネルの分離クラスターが形成される、第二タイプのヘキサゴナル・アレイ構造は、300 nmの典型的なチャンネル直径を有するオープンアレイ構造を示す。全体的なガラス構造は18 μ m直径のサブアレイのアレイよりなり、その各々が特異的DNAプローブまたは標的を含むよう供され、典型的には近隣のアレイから25 μ m間隔離れている。

実施例2：区別され離された結合領域を区画するウェルアレイ

実施例1に記載するNCGハイブリダイゼーション・アレイは、ナノチャンネル束のアレイを並べた孔のアレイを含む重合層の上側に結合し、各ハイブリダイゼーション部位内の生体分子の実質的に均一な試料(例えば、単一のDNA種)の配置用の試料ウェルとして供する。この重合試料ウェル・アレイは、脆いNCGウェハに対する物理的支持体をも供する。

孔の重合アレイは当該分野で公知の方法を用いて作製する。例えば、ここに記載する使用に適する重合層は、マイクロファブ・テクノロジーズ、インコーポレイテッド(MicroFab Technologies, Inc.)社から得ることができる。孔は、エキシマ・レーザー機械加工を用いて作製する。超小型電子工学産業で現在行われているように、低コスト/大量製造が可能な現存する技術を用いることができる。

ため、この方法が好ましい。

重合アレイの開発は、4つの課題：(1)材料の選択；(2)削摩工具細工およびプロセス開発；(3)積層工具細工およびプロセス開発；ならびに(4)高密および超高密重合アレイの作製よりなる。

これらの課題は、以下のように行う：

パートA：材料の選択

重合アレイに有用な材料は、充満ポリマー(filled polymer)、エポキシ樹脂および関連する複合(例えば、「回路-基板」-タイプの)材料である。それは超小型電子工学産業では標準的なプロセスであるため、本発明は、材料の販売業者によってあてがわれた接着剤と重合材料、例えば、 $12\mu\text{m}$ 厚層のB-ステージ(熱硬化性)接着剤とポリアミドを最も有利に用いる。

使用すべき重合アレイ材料の主な要件は：

1. エキシマ・レーザー機械加工への高い適合性：
 - i UV高吸収性(例えば、 193nm で $>4\times 10^5/\text{cm}$)
 - ii 高レーザー・エッチング速度(例えば、 $0.5\mu\text{m}/\text{パルス}$)および孔の低先細性(材料が深くなるにつれての孔直径の減少、例えば $<3^\circ$)；
 2. 1mm までの厚みが得られること；
 3. レザー削摩性で、かつナノ多孔性ウェハの結合に適した一面にB-ステージの接着剤が得られること；
 4. (積層工程の間に試料ウェルおよびNCGウェハの特徴の正確な配置を維持する)高い剛性および熱安定性；
 5. DNA溶液との和合性(すなわち、低い非特異的結合性)
- である。

パートB：削摩工具細工および処理

マスクエキシマレーザー加工技術が好ましい処理技術である。なぜなら、それは、プロジェクション・マスク・エキシマ・レーザー加工技術よりも低いコストの技術だからである。しかしながら、外観サイズが $50\mu\text{m}$ 未満である場合には、プロジェクション・マスクを用いる。削摩すべきマスクおよび材料を支持する

固定物に沿って、種々のパターンサイズおよび形態を有する1またはそれを超えるマスクを作製する。これらのマスクを用いてレーザー加工に最適な材料および最適な加工条件(すなわち、マスク孔サイズ、エネルギー密度、流入速度、等)を決定する。走査型電子顕微鏡および光学顕微鏡を用いてエキシマ・レーザー機械加工部位を検査し、寸法の変動を含む得られた寸法を定量する。

試料ウェルを重合材料に削摩することに加えて、接着材料も削摩する。この第二の削摩は、接着剤中の孔の直径が重合材料の接着側上の試料ウェルの直径よりも大きくなるように行う。このことにより、積層工程の間に、試料ウェルおよび/またはナノ多孔性ガラスへ接着剤が拡がるのが防がれる。

パートC：積層工具細工および処理

最初の積層工程プロセスの開発は、非削摩重合材料を用いて(または別法として、ガラス・スライドおよび/またはシリコン・ウェハーを用いて)行う。このプロセス開発の間に、硬化温度、圧力および定着を最適化する。その後に、最適化した処理指標を用いてナノ多孔性ウェハーおよび重合アレイの両方を積層する。2つの層の配列が機能性ウェルを作り出すように、最後の積層工程を行う。

パートD：重合アレイの作製

最適なマスクパターンおよびエキシマ・レーザー指標を決定し、その後に、接触マスクおよび材料支持定着物の製造で用いる。典型的には、多数(>100)の(使用に際しマスクを脱着させる)部品を生産するにはそのように作製する。

実施例3：多孔性シリコンウェハー

本明細書に記載したプロセスに従って、2種の一般的な型の多孔性シリコンデバイスを作製する。第一に、公知の微細加工法を用いて、集積試料ウェルによって連結されたウェハーを作製する。第二に、均質な多孔性ウェハー構造体を、NCGガラスアレイについて前記した(実施例2)の同一のオリイス試料ウェルに結合する。多孔性シリコン設計を本明細書では有利に用いる。なぜなら、低コスト大量生産プロセスへのその適合性、およびハイブリダイゼーション検出で機能し得るハイブリダイゼーション部位および構造(例えば、電極)への流体の流入および排出で機能する作製プロセス構造素子へ取り込まれるその能力のためであ

る。安定な、連続気泡多孔性材料を用いて向上させ、これらのデバイスに新たな特徴を質的に導入し、それによって区別され離れた単離結合領域の表面積が、ハイブリダイゼーションベースの電子工学、蛍光および放射ベースのDNA検出器において100~1000の率で上昇する。この目的の達成においては、表面検出部位における高-表面積支持体の制御された導入を用いる。

薄-フィルム加工技術を用いて、化学的に不活性で熱安定性のマイクロ多孔性材料を沈着させる。材料および加工方法を選択して、集積セミコンダクター検出器の低コストセミコンダクターのバッチ作製を達成する。マイクロチップデバイスは、常条件が変動する場合に結合強度のイン・サイチュ (in situ) 複数部位分析を提供する。多孔性シリコン材料は、方向付けられ、多アレイもしくはランダム相互接合ネットワークで、かつその孔直径をnm~数 μ mの範囲で選択して作製する。

多孔性シリコンは、電気化学エッチングを介して最も容易に作製される。それにより、2種の重要なオリフィス構造、すなわち、相互接合ネットワークおよび方向付けられたアレイに加工することができる。オリフィス直径は、ドーピングおよび電気化学的条件の選択により、約2nm~数 μ m直径に作製する。n-型材料については、エッチングは、電界濃縮効果を介して電子がオリフィス表面に注入されるトンネリング機構を通して進行するものと考えられる。p-型材料の場合においては、該機構は、電解質/シリコン界面におけるキャリア供給の減速

を介するようである。実際問題として、以下の構造を作製することができる：

i) 40-60%間隙率を有する密な相互接合ネットワーク層およびナノメーターサイズ様式の大きさのシリコンフィラメント。これは、軽くドーピングした($<1\Omega\text{-cm}$ 抵抗率) p-型シリコンで最も容易に得られる。

ii) エッチング条件に依存して、軸が優先的に $<100>$ 方向に沿って方向付けられ、かつ30-80%の間隙率を有する、典型的には10-nm直径のオリフィスの相互接合分岐ネットワーク。これは、 $10^{-1}\sim10^{-2}\Omega\text{-cm}$ 抵抗率のp-型材料で得られる。

iii) 軸が $<100>$ 方向に沿って方向付けられ、かつ10~100nmの範

囲のオリフィス直径を有する密に方向付けられたアレイ。 $10^{-2}\Omega\text{-cm}$ 未満の抵抗率を有するp-型材料で得られる。

i v) $\langle 100 \rangle$ 方向に沿って方向付けられ、かつ 10 nm 未満のオリフィス直径を有する孔の密な方向付けられたアレイ。 $10^{-1}\sim 10^{-2}\Omega\text{-cm}$ の抵抗率を有するn-型材料で得られる。

v) 軸が $\langle 100 \rangle$ 方向に沿って方向付けられ、 $\{100\}$ 平面によって規定される矩形側面を有し、かつ 100 nm 未満の範囲のオリフィス直径を有する矩形孔の密な方向付けられたアレイ。 $10^{-1}\sim 10^{-2}\Omega\text{-cm}$ の抵抗率を有するp-型材料で得る。

v i) 大きな($1\text{-}\mu\text{ m}$ -直径)孔の低密度相互接合ネットワーク。これは、軽くドーピングしたn-型材料で生じる。

これらの材料は前記のデバイス構造上に作製する。

特徴付けは、走査型電子顕微鏡によって行うことができる。表面の濡れ特性は、シリル化材料およびクロロカーボンでの蒸気処理を用いて変動させる。

モレキュラー・シーブとして機能する高-間隙率誘電体は、核トラックエッチングによって製造される。核トラックエッチングを用いて広範な無機材料でこれらのモレキュラー・シーブを製造するが、マイカおよびサファイアのごとき誘電体が最も頻繁に用いられる。米国特許第3,303,085号(プライス(Price)ら)に記載されているこの方法においては、

基体を最初に核粒子(典型的には数 MeV のアルファ粒子)と衝突させ、材料の正常な格子構造内に乱れまたは「トラック」を生じさせ、次いで、湿式-エッチングして、核粒子により引き起こされたトラックに従って孔を生じさせる。より特別には、プライス(Price)らは、マイカ基体を高エネルギー荷電粒子に暴すと、その格子構造中に実質的に直線の複数のトラックが形成され、これらのトラックは基体を湿式エッチングすることによって、孔に転化することができることを開示している。

孔サイズおよび全間隙率は、典型的には $0.2\text{ }\mu\text{ m}$ の直径で、 $10^9/\text{cm}^2$ オーダーの密度で可變的に制御可能である。粒子トラック深度は、入射粒子ビームの

エネルギーに依存するが、得られた孔は全体で $500\text{-}\mu\text{m}$ -厚の基体を通して伸長できる。前記に示したデバイス構造へのこれらの材料の取り込みは容易に達成される。加えて、センサー素子としてのインプランテーション-エッチングした誘電体の使用は、材料が親水性であるため、多孔性シリコンのアプローチに対して利点を有する。

好ましいデバイスは、図3に図示する集積試料ウェルを有する多孔性シリコンアレイウェハーである。これは、以下のごとく作製することができる：4インチ直径、 $\langle 100 \rangle$ 方向に沿って方向付けられた軸を有する $100\text{ }\mu\text{m}$ 厚の結晶シリコン (10^{15} P/cm^3 でドーピングしたn-型)ウェハーをフォトレジストでコートし、ウェハーの $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ の中心領域を横断するそれらの間に $200\text{ }\mu\text{m}$ 間隔を有する $200\text{ }\mu\text{m}$ 平方領域の 50×50 アレイを規定するためのマスクを通して光に暴す。次いで、ブイ・レーマン(V. Lehmann) (ジャーナル・オブ・エレクトロケミカル・ソサイエティー(J. Electrochem. Soc.)第140巻(100):2836-2843頁(1993年))によって記載されているプロセスを用いて、直径 $2\text{-}5\text{ }\mu\text{m}$ の密な間隔で、ウェハー表面に対して垂直に方向付けられたパッチを、ホトリソグラフ工程で規定した各正方形領域内に作製する。二酸化ケイ素の $300\text{ }\mu\text{m}$ 厚のウェハーをフォトレジストでコートし、シリコンウェハー中の $200\text{ }\mu\text{m}$ 平方領域を規定するのに用いるのと同じのマスクを通して光に暴し、酸エッチングを行って二酸化ケイ素ウェハー中に $2\text{ }\mu\text{m}$ 孔を作製する。次いで、

この二酸化ケイ素ウェハーを整列させ、標準的なウェハー結合プロセスを用いて多孔性シリコンウェハーに積層して図に示す集積構造を形成させる。高温アニリング工程の間に、各孔のシリコン表面を酸化して、二酸化ケイ素の層を形成させる。次いで、実施例4に記載するエポキシシラン-アミン連結工程を行い、アミン含有生体高分子種を該孔の壁に共有結合させる。

実施例4：ガラス/ SiO_2 へのオリゴヌクレオチド結合

パートA：ガラスのエポキシシラン処理

以下の比率：3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン 4 ml 、キシレン

1.2 ml、N, N-ジイソプロピルエチルアミン(フーニッヒ(Hunig)塩基) 0.5 mlにて、エポキシシランのストック溶液を新たに調製する。この溶液をウェハーの孔に流入させ、次いで、そのウェハーを80℃の該溶液に5時間浸漬し、次いで、テトラヒドロフランでフラッシュし、80℃にて乾燥し、ドライライト(Drierite)上の真空デシケーターに置くか、または乾燥アルゴン下のデシケーター中で保存する。

パートB：オリゴヌクレオチドの結合

5'-または3'-アルキルアミン(化学合成の間に導入した)を有するオリゴヌクレオチドを、水に10 μ M-50 μ Mにて溶解し、多孔性シリカウェハーに流入させる。65℃にて一晩反応させた後、その表面を65℃の水、次いで10 mM トリエチルアミンで簡単に流し、表面上の未反応エポキシ基を取り除き、次いで、65℃の水で再度流し、風乾する。水中で結合させる別法として、標的試料DNAの表面への非特異的な結合のより高いバックグラウンドがハイブリダイゼーション反応の間に生じ得るが(塩基対合とは独立)、アミン-誘導化オリゴヌクレオチドを、希釈KOH(例えば、10 mM-50 mM)中のエポキシシラン-誘導体化ガラスに37℃にて数時間で結合させることができる。

実施例5：ロボット工学流体デリバリー

特別の低容量シリンジおよび8-位置流体ヘッドを備えたハミルトン・ミクロラボ(Hamilton Microlab) 2000ロボット工学流体デリバリーシステムは、500 μ mのxyz段階で10-100 nlの容量を数%精度でデリバリーすることができる。この装置を用いて、生体分子の試料(例えば、DNA、オリゴヌクレオチド等) 40-nlを、高密度NCGウェハーのウェルに入れる。圧電的に制御されたサブステージ特注品をミクロラボ2200に付けることにより、xy位置決定をサブミクロン解像度まで下げられる。1-nl試料については、特注作製ニードルを用いる。8本-ニードル直線流体ヘッドをスタガー反復工程で操作して、ウェハーを横断する所望の近接間隔を作る。該システムは、数百の複製ハイブリダイゼーションウェハー作製能力を提供する、大きなステージ面積および迅速な動作制御を有する。

パートA：マイクロファブ微量流動ジェット

サブミクロン精度で表面にサブナノリットルの微量液滴をデリバリーする技術は当該分野(マイクロファブ・テクノロジー, インコーポレイテッド(Microfab Technologies, Inc.)社)で知られている。サブナノリットルDNA溶液をウェハー表面にデリバリーする能力を有するマイクロジェットシステムは以下のようにして用いる:超-高密度ウェハー内の個々のハイブリダイゼーション部位にDNAを1 nlの容量($130\text{ }\mu\text{m}$ 球または $100\text{ }\mu\text{m}$ 立方体に対応)で置くには、以下の流体容量用のマイクロ分注法としてインク-ジェット技術を用いた販売されている分注装置を用いる。インク-ジェット技術を用いて製造された液滴は高度に再現性で、デジタル的に保存したイメージデータに従って特定の時間に特定の位置に液滴を置くことができるよう制御できる。デマンドモードのインク-ジェットデバイス用の典型的な液滴の直径は $30\text{--}100\text{ }\mu\text{m}$ で、それは $14\text{--}520\text{ pl}$ の液滴容量に言い換えられる。デマンドモードのインク-ジェットデバイスの液滴生産速度は典型的に $2000\text{--}5000$ 液滴/秒である。かくして、デマンドモードのインク-ジェットマイクロ分注の解像度および処理能力は、超高密度ハイ

ブリダイゼーションウェハーに必要な範囲内である。

パートB：マイクロ分注システム

マイクロ分注システムは、マイクロファブ(MicroFab)液滴-即時回答インク-ジェット型デバイスから修飾し、以後マイクロジェットデバイスといい、この型のデバイスは 2000 /秒の速度で $50\text{ }\mu\text{m}$ 直径の液滴を生産することができる。この型のデバイスの操作原理は公知であり(ディー・ビー・ワラス(D. B. Wallace)、「集積液滴形成方法を用いた液滴-即時回答インク-ジェットデバイス型の特徴モデル化方法(A Method of Characteristics Model of a Drop-On-Demand Ink-Jet Device Using an Integral Drop Formation Method)」1989年、12月、エイエスエムイー(ASME)パブリケーション89-WA/FE-4)、修飾を行うために用いられた。処理能力を増大させるために、8個のこれらのデバイスを1インチ(25 mm)長未満で線状アレイに集積させる。8個のデバイスに同時に試薬を負荷し、順次分注して、同時に流す。全ての試薬が分注さ

れるまで、このプロトコルを繰り返す。大部分のサイクル時間は負荷および流した試薬に関連し、平行分注能力の全体の利点を制限している。典型的なサイクル時間は以下のオーダー：8試薬を流し、負荷するための1分；各試薬の着地位置を校正するのに30秒；各16ジェノセンサーの1位置に各試薬を分注させるために15秒、または8種全ての試薬を分注するために2分が必要である。かくして、16ジェノセンサー上に8種の試薬を負荷し分注する合計時間は3.5分間である。16センサー上に64種の試薬を分注させるための合計時間は28分間であろう。マイクロ分注システムは、以下に掲載するサブシステムよりなるであろう：

A. ミクロジェット分注ヘッド-8個のミクロジェットデバイスおよび要するデバイス電子工学のアセンブリー。8個の分注デバイスを多重化するための駆動電子工学の単一チャンネルを用いることによって、システムコストおよび複雑性を最小限化する。各個々のデバイスに必要な駆動波形は、システムコントローラーからダウンロードされる。駆動電子工学は常法を用いて作製する。

B. 流体分注システム-ベックマン・バイオメック (Beckman Biomec) を修飾して複数試薬流入システムとして作用させる。それおよびマイクロジェット分注ヘッドの間は、システム・コントローラーによって制御されるソレノイド弁のシステムである。これらは、加圧した流動流体(脱イオン水または食塩水)および空気を供して、該システムから試薬をパージし、真空にして試薬をシステムに負荷する。

C. X-Y位置決定システム-販売されている正確なX-Y位置決定システムを、コントローラーと共に用いる。0.2 μm の解像度および2 μm の精度が容易に得られる。位置決定システムは、16個のセンサーに適合するサイズとするが、ミクロジェット分注ヘッドのサイズ、パージ場所および校正場所は全体サイズの要件を決定する主因子を表している。

D. ビジョンシステム-ビジョン・システムを用いて、位置決定システムに対する各ミクロジェット・デバイスの「着地ゾーン」を校正する。校正は、各試薬負荷サイクル後に起こす。また、ビジョン・システムは、16個のセンサートレ

イを当該センサー上の基準マーカを介して最初に負荷した場合には、各センサー上に各分注部位を位置する。ハードウェアベースのビジョンシステムは有利に用いることができるが、経済的にはソフトウェアベースのシステムを用いる。

E. システム・コントローラー標準的なPCを全体システムコントローラーとして用いる。ビジョンシステム画像の収集および処理もシステム・コントローラーに属する。

実施例6：液体フロースルー

微細加工したハイブリダイゼーション支持体の孔内のDNAプローブまたは標的に結合させ、ハイブリダイゼーションおよび洗浄プロセスを行い、再-使用するために物質を処理し、さらなる分析のために結合材料を可能なら回収するために、ウェハーを通して液体を流動させる手段を設ける。ハイブリダイゼーションウェハーを通して液体を流動させるためには、上部貯蔵器および操作用の構造として供される2mm×4mmのポリプロピレン枠内にそれを充填する。ウェハーを真空マニホールドに固定させて密閉状態を形成するためにその上部のエッジに

デルリンO-リングを有するポリプロピレン真空チャンバーを用いる。真空アセンブリを図4に図示する。ウェハーを通る液体流動を制御するのに、フィードバック制御を有するスクリュ-駆動デバイスが供される。

実施例7：オリゴヌクレオチドの合成および誘導化

本発明で用いるべきオリゴヌクレオチドは、同時に百オリゴヌクレオチド以上を作製できる断片化合成戦略(ビーティー, ケイ・エル(Beattie, K. L.), ログドン, エヌ・ジェイ(Logsdon, N. J.), アンダーソン, アール・エス(Anderson, R. S.), エスピノーザ-ララ, ジェイ・エム(Espinosa-Lara, J. M.), マルドナード-ロドリゲス, アール(Maldonado-Rodriguez, R.)およびフロスト, ジェイ・ディーIII世(Frost, J. D.), 1988年、バイオテクノル・アプル・バイオケム(Biotechnol. Appl. Biochem.)第10巻: 510-521頁; ビーティー, ケイ・エル(Beattie, K. L.)およびフロウラー, アール・エフ(Flowler, R. F.) 1991年、ネイチャー(Nature)第352巻 548-549頁、26、27)を用いた、ホスホルアミダイト化学によって合成する(ビューケッジ, エス・エ

ル(Beaucage, S. L.)およびカルサーズ, エム・エイチ(Caruthers, M. H.)テトラヘドロン・レターズ(Tet. Lett.)第22巻:1859-1862頁(1981年))。該オリゴヌクレオチドは、5'-末端または3'-末端のいずれかで、化学合成の間にアルキルアミノ官能基で誘導化できる。

パートA: ガラスへの結合の化学

二酸化ケイ素表面にDNAを結合させる最適の方法は、よく確立されたシリコン化学に基づいている(パークム, エム・イー(Parkam, M. E.)およびロウドン, ジー・エム(Loudon, G. M.)(1978年)バイオケミカル・アンド・バイオフィジックス・リサーチ・コミュニケイションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.)第1巻:1-6頁; ルンド, ブイ(Lund, V.), シュミッド, アール(Schmid, R.), リックウッド, ディー(Rickwood, D.)およびホルネス, イー(Hornes, E.)(1988年)ヌクレック・アシッズ・リサーチ(Nucl. Acids Res.)第16巻:

10861-10880頁)。この化学を用いて、オリゴヌクレオチド上の末端第一級アミン基と特異的に反応する末端エポキシド基を有するガラスにリンカー基を導入する。(エポキシシランを用いる)この用途の広いアプローチは安価であり、末端を修飾した(アミノ-またはチオール誘導化)オリゴヌクレオチドに容易にカップリングできる単層の密なアレイを供する。エポキシシラン化ガラスへの結合の間に、長鎖アミノアルコールとアミン-誘導化オリゴヌクレオチドとを混合することにより、プローブ結合の密度は広範囲にわたって制御される。この戦略は、より短鎖のアルコールが散在し、表面から50 Å離れてオリゴヌクレオチドが伏して結合するDNAがつなぎ留められた単層を実質的に作製する。所望により、化学合成の間にトリエチレングリコール・ホスホリル単位を導入することにより、可変長のスペーサーをオリゴヌクレオチドの末端に導入することもできる。これらの可変リンカー・アームは、標的DNA鎖と対合するために容易に接近できるように、表面オリゴヌクレオチド・プローブがどれくらいの距離離されていないかを測定するのに有用である。金表面上での単層の生成についてのホワイトサイズ(Whitesides)および共同研究者の方法(ランドール・リー, ティー(Randall lee, T), ライビニス, ピイ・イー(Laibinis, P. E.),

フォルカーズ, ジェイ・パイ (Folkers, J. P.) およびホワイトサイズ, ジェイ・エム (Whitesides, G. M.) (1991年) ピュア・アンド・アプライ・ケム (Pure & Appl. Chem.) 第63巻: 821-828頁およびそこに引用されている参照) から適用されたチオール化学を用いて、金および白金表面にDNAを結合させる。ジチオール(例えば、1,10-デカンジチオール)は、プロモアセチル化オリゴヌクレオチドと反応する末端の反応性チオール基を供する。金または白金表面へのDNAの結合密度は、明確なモノチオールおよびジチオールの混合物を用いることによって、表面活性化ステージで制御する。

パートB: 組換えベクターDNA、cDNAおよびPCR断片の表面固定化
合成オリゴヌクレオチドの表面への共有結合には、前記した化学的方法を最も有利に用いる。エポキシシラン化ガラス表面へのより長鎖の核酸鎖の結合には、

環窒素有する表面エポキシ基と長鎖DNA鎖に沿った環外のアミノとを比較的遅く反応せて固定化を達成する。日常的な実験を通して、バルクの固定化された配列をハイブリダイゼーションに利用可能なまま残すように、標的一個当たり数部位で非修飾拡散分子が固定化される条件を決定する。白金または金で被覆したナノチャンネルに固定化させる場合には、5-ヘキシルアミン-dUTP存在下での重合(PCRまたはランダム・プライミング)を用いて最初にヘキシルアミン基を標的DNAに導入し、次いでプロモアセチル化工程を行って、チオール化金属表面へ結合させるためにDNAを活性化する。再度、日常的な実験を用いて(dTTP/5-ヘキシルアミン-dUTP比および付着時間を変化させる)、再現性のあるハイブリダイゼーションの結果が得られる条件を決定する。

前記の方法(プロモアセチル化工程を省いた)も、標的DNAをガラス表面に固定化する別法として供することができる。

パートC: DNA結合能力

標識オリゴヌクレオチドの平面ガラスおよび金表面への結合の定量的な測定に基づくと、 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ 領域中の 10^8 に達するプローブに相当する、表面上に $50\text{-}100\text{\AA}$ 離れて末端結合はプローブを位置させる。約 $10^{10}\text{-}10^{11}$ オリゴヌクレオチド・プローブをナノ微細加工ウェハー中の多孔性シリコンの5

0 μm 立方体内につなぎ留めることができる。結合反応の前に末端-標識することによって断面積当たりの結合オリゴヌクレオチドの密度を概算し、次いでホスホリメーザーを用いて放射能を定量する。表面上に乾燥させた既知量の標識オリゴヌクレオチドを用いて、結合密度の測定値を校正する。温和な塩基中でヘキシルアミンを運搬するプラスミドDNAをエポキシシラン化平面ガラス表面に共有結合させたデータから、ガラス表面 mm^2 当たり少なくとも 10^7 のpBR322分子を結合させることができることが判明する。ナノ微細加工ウェハーのプローブ内のこの密度に基づけば、ウェハー断面積 mm^2 当たり 10^9 - 10^{10} 分子の変性プラスミドDNAの固定化が達成される。

実施例8：ハイブリダイゼーション条件

パートA：試料調製

標的DNA（分析物）は、増幅の間に産物に $[^{32}\text{P}]$ ヌクレオチドを取り込ませるポリメラーゼ連鎖反応によるか、またはガンマ- ^{32}P [ATP]+ポリヌクレオチド・キナーゼを用いて増幅産物を5'-標識することによって調製する。取り込まれなかった標識はセントリコン(Centricon)濾過によって除去する。好ましくは、1のPCR断片を5'-ビオチン標識して、ストレプトアビジン・アフィニティークロマトグラフィーによる一本鎖の調製ができる。少なくとも5 nM (5 fmol/ μl)の濃度であって、少なくとも5,000 cpm/fmolの特異活性のハイブリダイゼーション緩衝液(50 mM トリス-HCl、pH 8、2 mM EDTA、3.3 M 塩化テトラメチルアンモニウム)中に標的DNAを溶解する。数百塩基長のPCR断片が、少なくともオクタマー長の表面につなぎ留めたオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに適している。

パートB：ハイブリダイゼーション

標的DNA試料をチップの多孔性領域に流し込み、6℃にて5-15分間インキュベートし、次いで18℃にて同様の時間、多孔性チップを通してハイブリダイゼーション溶液を流動させることによって洗浄する。別法として、塩化テトラメチルアンモニウムの代わりに、1 M KClもしくはNaClまたは5.2 M ベタインを含有する緩衝液でハイブリダイゼーションを行うこともできる。

パートC：ハイブリダイゼーション感度の最適化(誤対合を含有するハイブリッドに対する識別性)

前記した実験条件によって、一般に、完全なハイブリッドと誤対合を含有するハイブリッドとの間の許容できる識別性が得られるが、ある種の分析には、幾つかの条件を最適化することが望ましい。例えば、短鎖オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションには、ハイブリダイゼーションの温度および洗浄を、5℃～30℃の範囲にわたり変動することができる。より長いプローブを用いるハイブリ

ダイゼーションには、より高い温度が望ましい。

実施例9：ハイブリダイゼーションの定量的検出

パートA：ホスホルイメージャーおよびフィルム検出

ハイブリダイゼーション強度の検出および定量は、広く利用可能である方法：ホスホルイメージャーおよびフィルムを用いて行う。バイオラド(Biorad)ホスホルイメージャーは約100 μ mの試料解像度を有し、ベータ線放射および化学ルミネセンス標識からの光放出の両方を自記することができる。各々、477nmおよび428nmの光を発するミリポア(Milipore)社およびニュー・イングランド・ニューキュラー(New England Nuclear)社から入手可能な化学ルミネセンス検出用の試薬キットを、バイオラド(Biorad)装置と有利に用いる。化学ルミネセンス標識は、供給業者によって推奨されている方法を用いて標的DNA試料(ランダムプライマー化ベクターDNAまたはPCR断片)に取り込ませる。その後、オリゴヌクレオチド・プローブを担持するナノ多孔性ウェハーにそのDNAをハイブリダイズさせる。放射能標識物(ランダムプライマー化およびPCR反応によって取り込ませた³²Pおよび³³P)もこの実験に用いる。比較用にはフィルム感光を用いる。表面固定化標的DNAと標識オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの場合においては、オリゴヌクレオチドに最適な化学ルミネセンス標識方法を一般に利用できないため、最も好ましくは放射能標識物を用いる(ポリヌクレオチド・キナーゼを用いて取り込ませる)。

パートB：CCD検出装置

CCDジェノセンサー装置は最大の解像度および感度が可能で、化学ルミネセント、蛍光および放射能標識と共に用いられる(ラムチャー, ジェイ・エル(Lamtur e, J. L.)), ベルマ, アール(Verma, R.)), フォウラー, アール(Fowler, R.)), スミス, エス(Smith, S.)), ホーガン, エム(Hogan, M.)), ビーティー, ケイ・エル(Beattie, K. L.)), エッガーズ, エム(Eggers, M.)), アーリック, ディー(Ehrlich, D.)), ホリス, エム(Hollis, M.))およびコシッキ, ビイ(Kosicki, B.)),

1993年、ネイチャー(Nature)、前掲。

実施例10: ジェノセンサー実験; ハムスターh p r t遺伝子のエキソン7/8領域における突然変異検出

h p r t 遺伝子は突然変異の実験のモデル系として広範に用いられている。該遺伝子は、数種の哺乳動物からクローン化され配列決定されている。ハムスター(チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞系で化学物質および放射線によって誘導した)において、およびヒト(レッシューナイハン症候群に関連する)から、この遺伝子における種々の突然変異が知られており、DNA配列決定によって特徴付けられた。h p r t 突然変異の重要な画分はエキソン7および8によってコードされる短い領域の遺伝子に見出されている。正常遺伝子および突然変異遺伝子のヌクレオチド配列は以下の刊行物に見出される: エドワーズ, エイ(Edwards, A.)), ボス, エイチ(Voss, H.)), ライス, ピイ(Rice, P.)), シビテロ, エイ(Civitello, A.)), ステージマン, ジェイ(Stegemann, J.)), シュワガー, シイ(Schwager, C.)), ジニーマーマン, ジェイ(Zinimermann, J.)), エルフル, エイチ(Erfle, H.)), カスキー, シイ・ティー(Caskey, C. T.))およびアンソージ, ダブリュ(Anosorge, W.))(1990年)、「ヒトH P R T遺伝子座の自動化DNA配列決定(Automated DNA Sequencing of the Human H R P T Locus)」ジェノミクス(Genomics)第6巻: 593-608頁; ギブス, アール(Gibbs, R.)), ニューエン, ピー-エヌ(Nguyen, P.-N.)), エドワーズ, エイ(Edwards, A.)), シビテロ, エイ(Civitello, A.))およびカスキー, シイ・ティー(Caskey, C. T.))(1990年)、「レッシューナイハン・ファミリーにおけるヒポキサンチン・ホスホリボシルトランスフェラーゼの複合DNA欠損検出およびエキソン配列決定(Multiplex DN

A Deletion Detection and Exon Sequencing of the Hypoxanthine Phosphoribosyl-transferase Gene in Lesch-Nyhan Families)」ジェノミクス(Genomics)第7巻: 235-244頁; ユ, ワイ(Yu, Y.), ズ, ゼット(Xu, Z.), ギブス, アール(Gibbs, R.)およびシー, エイ(Hsie, A.), 「チャイニーズ・ハムスター細胞のヒポキサンチン-グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子座に

おける突然変異スペクトル分析用のポリメラーゼ連鎖反応に基づく包括的方法(Polymerase chain reaction-based Comprehensive Procedure for the Analysis of the Mutation Spectrum at the Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase locus in Chinese Hamster Cells)」エンバイロン・モル・ミュータジェン(Environ. Mol. Mutagen.)第19巻: 267-273頁; ならびにズ, ゼット(Zu, Z.), ユ, ワイ(Yu, Y.), ギブス, アール(Gibbs, R.), カスキー, シイ・ティー(Caskey, C. T.)およびシー, エイ(Hsie, A.)(1993年), 「チャイニーズ・ハムスター細胞のhprt遺伝子座における複合DNA増幅および固相直接配列決定(Multiplex DNA Amplification and Solid-phase Direct Sequencing at the hprt Locus in Chinese Hamster Cells)」ミューテーション, リサーチ(Mutat. Res.)第282巻: 237-248頁。ハムスターhprtエキソン7/8領域のcDNA・ヌクレオチド配列を以下のごとく掲載する:

500	520	540
GCAAGCTTGC TGGTGAAAAG GACCTCTCGA AGTGTTGGAT ATAGGCCAGA CTTTGTGGA		
560	580	600
TTTGAAATTC CAGACAAGTT TGTGTGTTGA TATGCCCTTG ACTATAATGA GTACTTCAGG		
GATTTGAATC (配列番号: 1)		

以下に、CHO突然変異を上(↑)に、ならびにヒト(h)およびマウス(m)配列の相違を下(↓)に示すエキソン7/8領域中のハムスターhprtゲノムDNAのヌクレオチド配列を表す。「5'-a a c a g C T T G」で開始し、「5'-G A C T g t a a g」で終止するDNA配列を、ハムスター、ヒトおよびマウスの配

列については配列番号：2として、CHO細胞の配列については配列番号：5として示す。「5'-t a c a g T T G T」で開始し、「G A A T g t a a t」で終止する残りのDNAを、ハムスター、ヒトおよびマウスの配列については配列番号：4として、CHO細胞の配列については配列番号：5として示す。

```

-----
      |
-aacagCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAGTGTGGATATAGGCCAG
      |  |                      | |
      C  A                      C A
      h  h                      m h
      G                          -
      |                          |
ACTgtaag----tacagTTGTTGGATTTGAAATTCAGACAAGTTTGTTC
      +A                          C
      |                          |
TTGGATATGCCCTTGACTATAATGAGTACTTCAGGGATTTGAATgtaat-
      |                          |  |
      A                          A  A
      h                          h  h

```

配列の最初の小文字は、エキソン7の5'-側のイントロン配列を表す。エキソン7および8の間の幾つかのフランキング-イントロン配列は二行目に(小文字で)示し、再度、エキソン8の後の小さなストレッチのイントロン配列が末端にある。配列中の下線を付けた塩基は、DNA試料が利用できる突然変異を表し、このことは、この領域を標的化するDNAチップが突然変異を検出し同定できることを証明するのに用いることができる。前記の配列は、10-塩基欠損(1行目)、単一塩基欠損(二行目)、単一塩基挿入(三行目)および単一塩基置換(二行目および三行目)を包含する、化学物質および放射線によって誘導されたハムスター(CHO)細胞中の突然変異を示している。以下の配列は、ハムスターおよびヒト(h)およびマウス(m)の間の単一塩基の相異を示している。

エキソン7/8領域を横断する2塩基によって重複するオリゴヌクレオチド・プローブ(8重体-10重体長)のセットを、以下の配列番号：2-5に示す：

```

      ----2----      ----4----      ----6----
----1----      ----3----      ----5----      --7--
-aacagCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAGTGTGGATATAGGCCAG
              | | | |
              C A -10 C A
      ----8----      ----10----      -12-
-7-              ----9-----      ----11---
ACTgtaag----tacagTTGTTGGATTGAAATTCCAGACAAGTTTGTG
              | |
              G -
--12-      ----14---      ----16----      ----18---
      ----13---      ----15---      ----17---
TTGGATATGCCCTTGACTATAATGAGTACTTCAGGGATTGGAATgtaat
| | | |
A +A A A
C

```

このセットのプローブを選択してこの領域におけるいずれの突然変異も検出し、その長さを調節して、二重らせん安定性に影響する塩基組成を補充する(A-Tリッチな領域にはより長いプローブ)。プローブおよびプライマー配列を以下の表 I に示す：

表 I : h p r t 突然変異検出用のオリゴヌクレオチド

エキソン7および8用のPCRプライマー：

名称 配列(5-3)

MHEX71	GTTCTATTGTCTTTCCCATATGTC (配列番号：6)
MHEX82	TCAGTCTGGTCAAATGACGAGGTGC (配列番号：7)
HEX81	CTGTGATTCTTTACAGTTGTTGGA (配列番号：8)
HEX82	CATTAATTACATTCAAATCCCTGAAG (配列番号：9)

5'-末端にアミンを有する9重体

名称	配列 (5'→3')	名称	配列 (5'→3')
-A (554)	TGCTGGAAT	1	AGCAAGCTG
		2	TTTCACCAG
+A (586/7)	ACTCATTATA (配列番号: 10)	3	AGGTCCTTT
		4	CTTCGAGAG
-10 (509-518)	TATATGAGAG (配列番号: 11)	5	TCCAACACT
		6	GCCTATATC
A-G (545)	ATTCCAAATC (配列番号: 12)	7	AGTCTGGC
		8	TCCAACAACT (配列番号: 13)
G-C (601)	CAAATGCCT	9	ATTTCAAATC (配列番号: 14)
		10	GTCTGGAAT
		11	ACAAACTTGT (配列番号: 15)
		12	TCCAACAAC
		13	GGGCATATC
		14	TAGTCAAGG
		15	ACTCATTATA (配列番号: 16)
		16	CTGAAGTAC
		17	CAAATCCCT
		18	AATTACATTCA (配列番号: 17)

前記実施例による高密度または超高密度微細加工装置を作製し、ウェハーの結合領域内でオリゴヌクレオチド・プローブを結合させる。含まれるのは、正常なプローブ(1-18)+前記突然変異(各々部位19および20)を含む、5種の異なる既知の突然変異に相当する特異的プローブである。前記したものは、2セットのPCRプライマー(表I)を用いて、ハムスターゲノムDNAのエキソン7/8領域を増幅させる。増幅の間に放射能標識(³²P)をPCR断片に取り込ませる

ことによって、オートラジオグラフィーおよびホスホリメジャーによるハイ

ブリダイゼーションの検出が可能となる。図5は、前記のプローブがDNAチップ(前記に番号付けした)内の特異的試験部位の表面に1末端で結合した場合の結果を図示している。2種の突然変異(左側の10-塩基欠損および右側のA→Gのトランジション)の理想的なハイブリダイゼーション/パターンを下部に示す。

実施例11：多孔性シリコン中に配列したcDNAクローンを用いた遺伝子発現の特徴付け

パートA：多孔性シリコンウェハの作製

集中試料ウェルを有する多孔性シリコンウェハの作製につき実施例3に概説した方法に従い、ウェハの表面にわたって400 μ m(中心から中心まで)離れた、200 μ m²孔パッチの50 \times 50アレイを有するウェハを得る。ウェハの孔を活性化して、実施例4に記載したエポキシシランとの反応によってアミン-誘導化ポリヌクレオチドを結合させる。

パートB：cDNAアレイの形成

正常化ヒトcDNAライブラリーから選択した2,500セットのM13クローンを、5'-ヘキシルアミン-dUTPの存在下でポリメラーゼ連鎖反応に付して、cDNAインサートを増幅させ該鎖に第一級アミンを取り込ませる。そのPCR産物をエタノール沈殿させ、水または10mM KOHに溶解し、100℃にて5分間熱変性させ、次いで氷上でクエンチし、8本針の調剤ヘッドを備えたハミルトン・マイクロラボ2200流体デリバリーシステムを用いて多孔性ウェハの個々の試料ウェルに付する。全てのcDNA断片を調剤した後に、下部から僅かな真空を簡単に付して、流体が孔を占めていることを確認する。室温にて一晩または60℃にて30-60分間インキュベートした後、該多孔性ウェハに温水を流し、次いで50mMトリエチルアミンと反応させて表面上の未反応エポキシ基をキャップ・オフ(cap off)し、ついで再度温水を流し風乾させる。

パートC：発現遺伝子の3'-領域を表す標識PCR断片の調製

DNAアーゼIで処理してDNA夾雑物を除去し、次いでフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿させる、コムジンスキー(Chomczynski)およびサッチ(Sacchi)(アナリス・イン・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)第16

2巻：156-159頁(1993年))の方法によって培養細胞から細胞質RNAを抽出する。逆転写酵素およびPCRは、ニシオ(Nishio)ら(ファセブ・ジャーナル(FASEB J.)第8巻：103-106頁(1994年))の「ディファレンシャル・ディスプレイ(differential display)」に記載のごとく行う。ハイブリダイゼーションの前に、PCR産物を $[A-^{32}P]$ dNTPの存在下のランダム・プライミングによって標識し、取り込まれなかった標識はセントリコン濾過によって除去する。

パートD：発現配列のcDNAアレイへのハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションの前に、1%「ブロット(Blotto)」溶液または50 mMトリポリホスフェートを多孔性シリコンウェハーを通して流し、標的DNAの非特異的結合を最小限とし、次いで、多孔性シリコン・アレイをハイブリダイゼーション溶液(50 mM トリス-HCl、pH 7.5、1 mM EDTA、1 M NaCl)で洗浄する。発現遺伝子の3'-末端を表す標識PCR断片をハイブリダイゼーション中のセントリコン(Centricon)濾過ユニットから回収し、全体の多孔性ウェハーをこのDNA溶液で満たす。多孔性ハイブリダイゼーション・モジュールを65℃に置き、低真空チャンバーに接続した蠕動ポンプを用いて、ウェハーの孔を通して標識DNAを30-60分間の工程にわたり徐々に流す。該多孔性ウェハーを65℃にてハイブリダイゼーション緩衝液で3回洗浄する。

パートE：ハイブリダイゼーション・シグナルの定量

ハイブリダイゼーションおよび洗浄の後、該多孔性ウェハーを簡単に乾燥し、次いでホスホルイメージャーのホスホル・スクリーン上に置き、標識の強度によって測定した時間、暗所に維持する。次いで、アレイ中の各多孔性領域から生じる

個々のハイブリダイゼーション・シグナル量を定量するため、ホスホル・スクリーンをホスホルイメージャー・リーダーに置く。

図6は、ハイブリダイゼーション実験から得られる結果を図示している。全細胞質mRNAを2種の条件下で培養した細胞から単離し、前記の「ディファレンシャル・ディスプレイ」法に付し、2種の条件下に存在する個々のmRNA種の

代表する断片を調製する。これらの試料を2種の同一のcDNAアレイにハイブリダイズさせると、示す2種のハイブリダイゼーション・シグナルパターンが得られる。該パターンは、2種の異なる培養条件(例えば、ある種の遺伝子の発現性における変化を誘導する薬剤または化学物質の存在下または不存在下)下での発現遺伝子の特徴を表している。全体的に、ハイブリダイゼーションのパターンが2種の条件で同様であるが、2種の培養条件下で特定の遺伝子の異なる発現は予想通りであり、培養条件1でのみ認められる数種のハイブリダイゼーション・シグナルがあり、培養条件2でのみ認められる数種のものがあることを注意すべきである。視覚的な比較を補助するために図の下部に再現した下部左側のボックスは、遺伝子発現特性の幾つかの相違を表している。正方形はハイブリダイゼーションが起こる部位を表し、暗色の正方形は各部位に存在する標識断片の数に比例する。

配 列 表

(1)一般情報

(i)出願人：ビーティ, ケネス・エル(Beattie, Kenneth L.)

(ii)発明の名称：結合反応を別々に検出するための微細加工したフロースルー多孔性装置

(iii)配列の数：17

(iv)通信住所：

(A)受取人：ビンソン・アンド・エルキンス(Vinson & Elkins)

(B)通り：エヌ・ダブリュ、ペシルベニア・アベニュー1455番

(C)都市：ワシントン

(D)州：ワシントン・ディー・シイ

(E)国籍：合衆国

(F)郵便番号：20004-1008

(v)コンピューター判読型：

(A)媒体のタイプ：フロッピーディスク

(B)コンピューター：IBM PC コンパチブル

(C)オペレーティング・システム：PC-DOS/MS-DOS

(D)ソフトウェア：パテントイン・リリース(Patent In Release)#1.0、
バージョン#1.25

(vi)最新出願データ

(A)出願番号：US08/141,969号

(B)出願日：1994年10月28日

(C)分類：

(viii)代理人/代理事務所情報：

(A)氏名：サンゾ, マイケル・エイ(Sanzo, Michael A)

(B)登録番号：36,912

(C)参照/ファイル番号：HARC0001

(ix)電信電話情報：

(A)電話番号：(202)639-6500

(B)ファックス番号：(202)639-6604

(2)配列番号：1に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：130塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：二本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)分子型：cDNA

(xi)配列：配列番号1：

GCAAGCTTGC TGGTGAAAAG GACCTCTCGA AGTGTTGGAT ATAGGCCAGA CTTTGTGGGA	60
TTTGAAATTC CAGACAAGTT TGTGTGGGA TATGCCCTTG ACTATAATGA GTACTTCAGG	120
GATTTGAATC	130

(2)配列番号：2に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：57塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：二本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)分子型：DNA(ゲノミック)

(iv)起源：

(A)生物：ハムスター、ヒトおよびマウス

(xi)配列：配列番号2：

AACAGCTTGC TGGTGAAAAG GACCYCTMGA AGTGTTGGAT AYARGCCAGA CTGTAAG	57
--	----

(2)配列番号：3に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：47塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：二本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)分子型：DNA(ゲノミック)

(iv)起源：

(A)生物：CHO細胞

(xi)配列：配列番号3：

AACAGCTTGC TGGTGAAAAG GACCTCTCAT ATAGGCCAGA CTGTAAG

47

(2)配列番号：4に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：87塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：二本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)分子型：DNA(ゲノミック)

(iv)起源：

(A)生物：ハムスター、ヒトおよびマウス

(xi)配列：配列番号4：

TACAGTTGTT GGATTGAAA TTCCAGACAA GTTTGTTGTW GGATATGCCC TTGACTATAA

60

TGARTACTTC AGGRATTGA ATGTAAT

87

(2)配列番号：5に関する情報：

(i)配列の特徴：

- (A)配列の長さ：87塩基対
- (B)配列の型：核酸
- (C)鎖の数：二本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状
- (i i)分子型：DNA(ゲノミック)
- (i v)起源：
 - (A)生物：CHO細胞
- (x i)配列：配列番号5：

TACAGTTGTT GGATTGGAA TTCCAGCAAG TTTGTTGTTG GATATGCCCT TGACTATAAA 60

TGAGTACTTC AGGCATTGA ATGTAAT 87

(2)配列番号：6に関する情報：

- (i)配列の特徴：
 - (A)配列の長さ：24塩基対
 - (B)配列の型：核酸
 - (C)鎖の数：両方
 - (D)トポロジー：直鎖状
- (x i)配列：配列番号6：

GTTCTATTGT CTTTCCCATA TGTC 24

(2)配列番号：7に関する情報：

- (i)配列の特徴：
 - (A)配列の長さ：25塩基対
 - (B)配列の型：核酸
 - (C)鎖の数：両方
 - (D)トポロジー：直鎖状
- (x i)配列：配列番号7：

TCAGTCTGGT CAAATGACGA GGTGC

25

(2)配列番号：8に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：24塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：両方

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号8：

CTGTGATTCT TTACAGTTGT TGGA

24

(2)配列番号：9に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：26塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：両方

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号9：

CATTAATTAC ATTCAAATCC CTGAAG

26

(2)配列番号：10に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：11塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：両方

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号10：

ACTCATTAT A

11

(2)配列番号：11に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：10塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：両方

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号11：

TATATGAGAG

10

(2)配列番号：12に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：10塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：両方

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号12：

ATTCCAAATC

10

(2)配列番号：13に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：10塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：両方

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号13：

TCCAACAAC

10

(2)配列番号：14に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：10塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：両方

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号14：

ATTTCAAATC

10

(2)配列番号：15に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：10塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：両方

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号15：

ACAAACTTGT

10

(2)配列番号：16に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：10塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：両方

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号16：

ACTCATTATA

10

(2)配列番号：17に関する情報：

(i)配列の特徴：

(A)配列の長さ：11塩基対

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：両方

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号17：

AATTACATTC A

【図1】

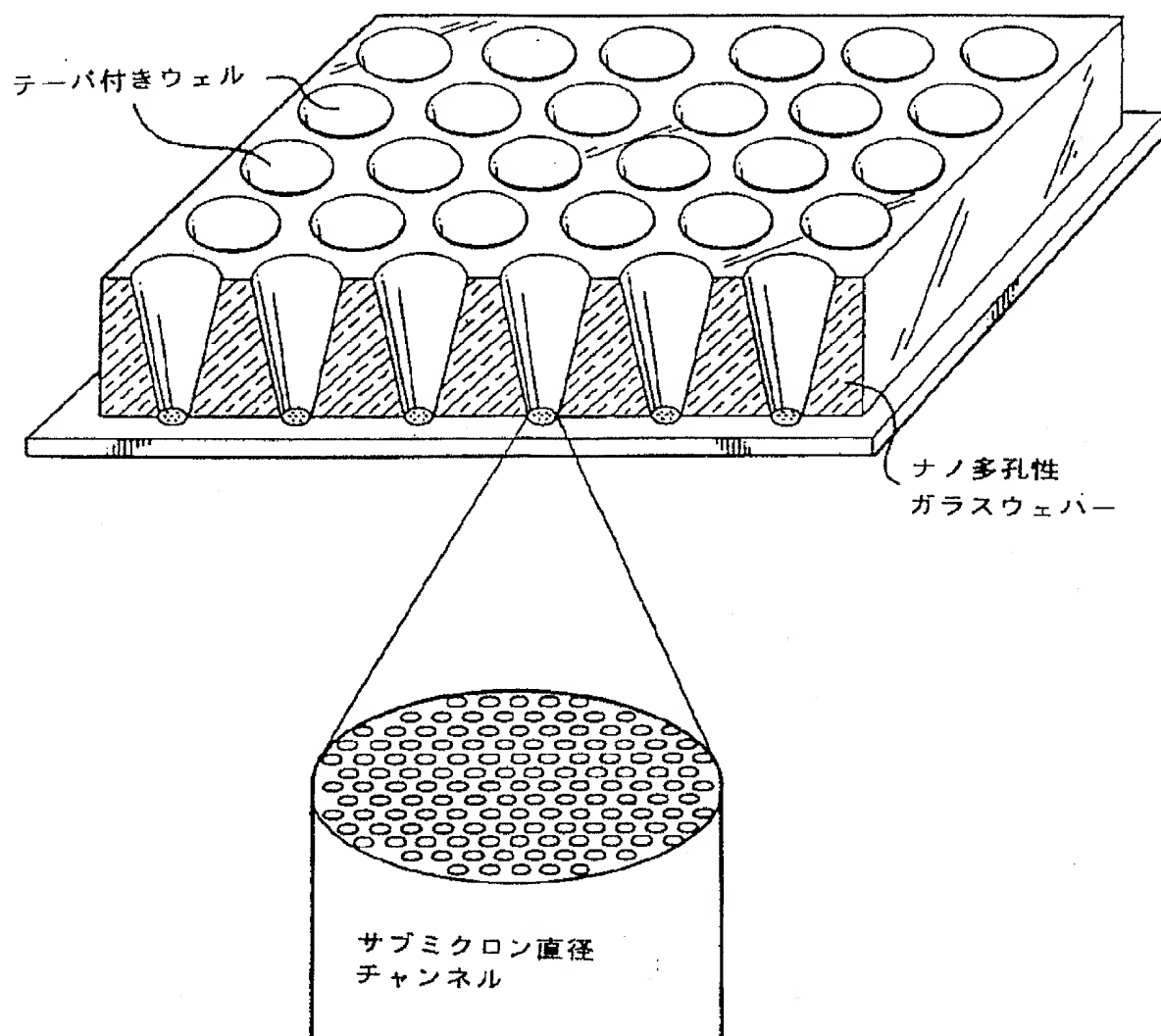


FIG. 1

【図2】

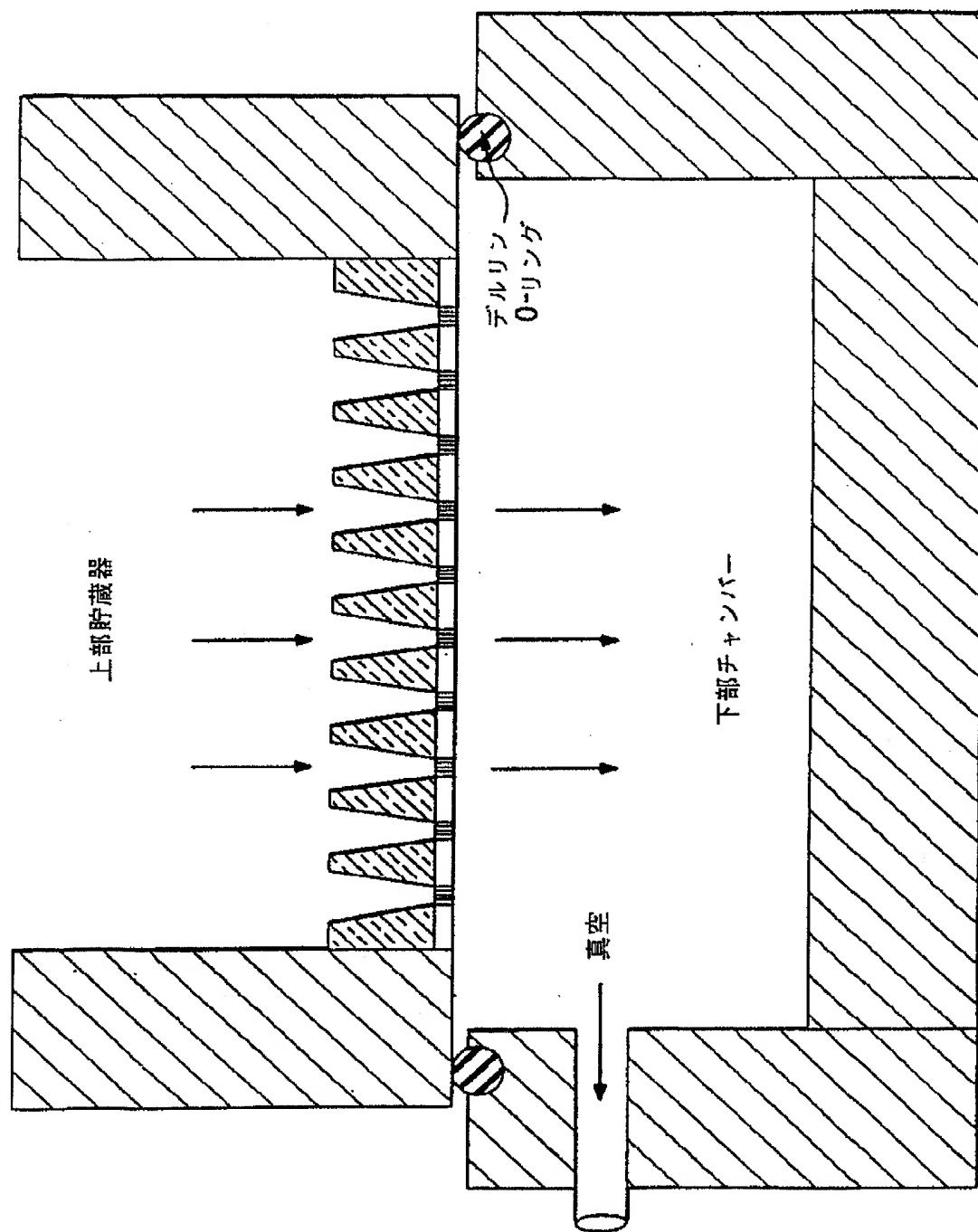


FIG. 2

【图3】

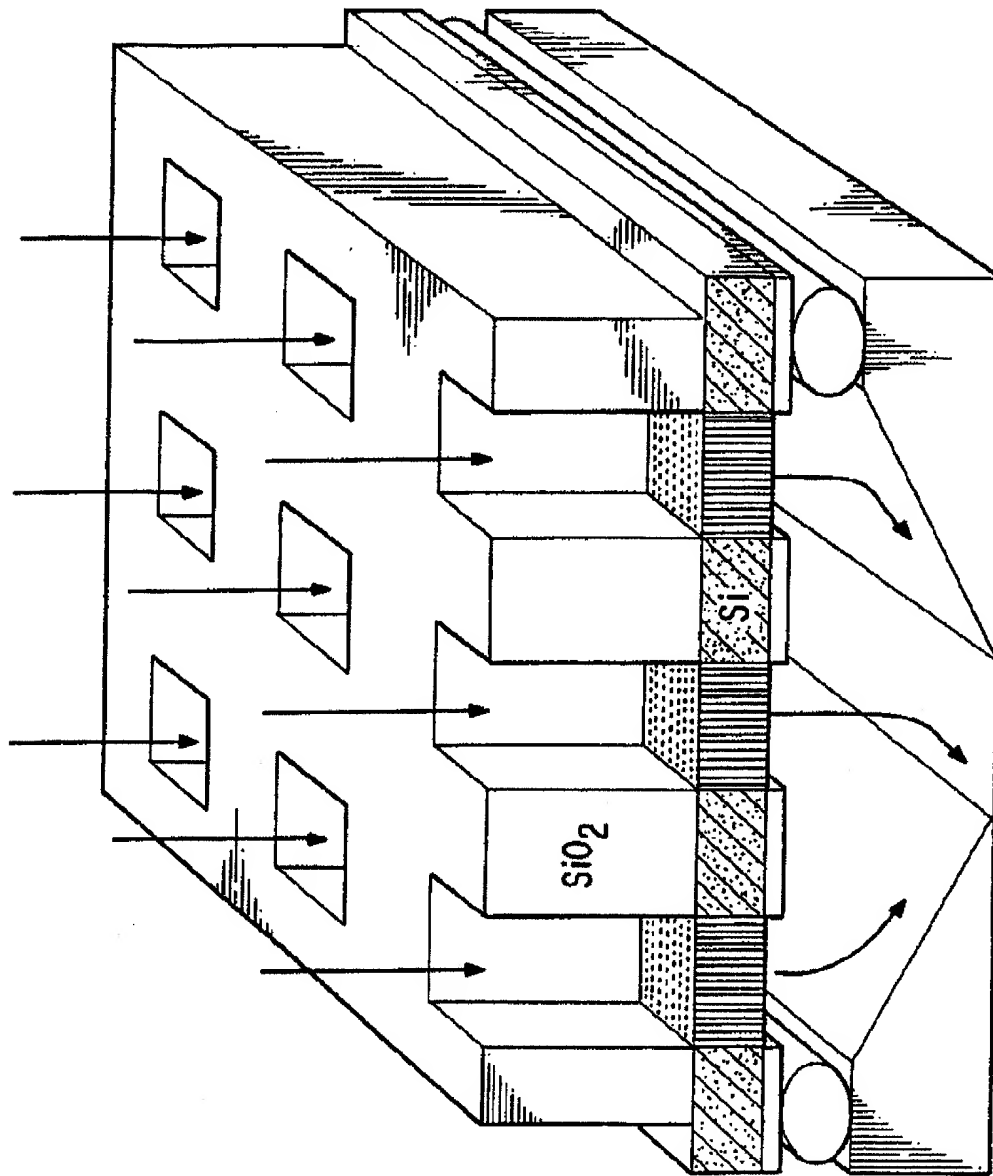


FIG. 3

【図4】

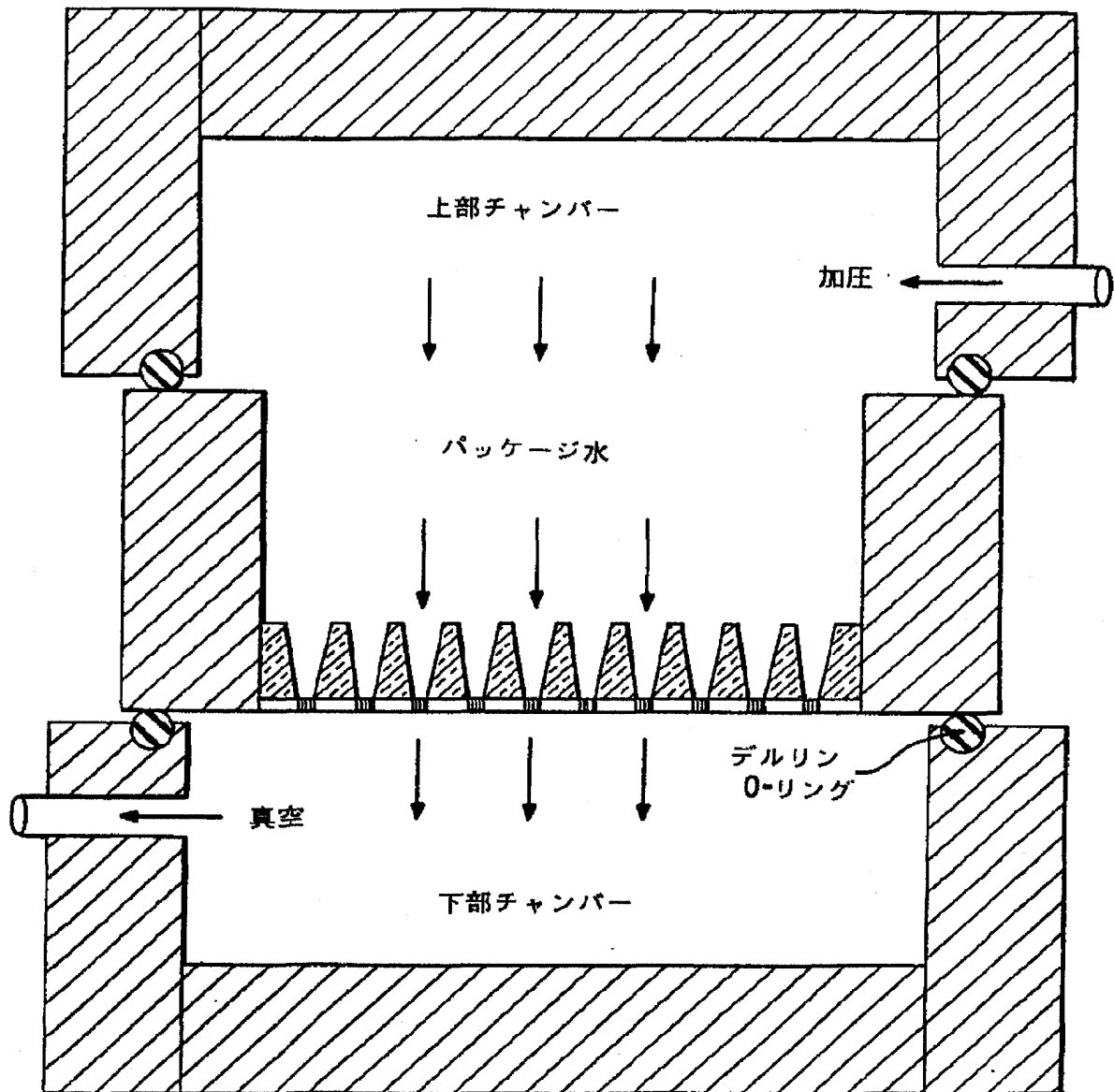
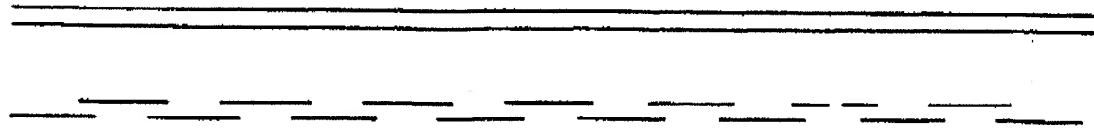


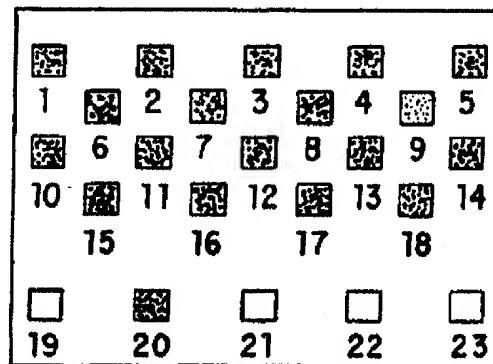
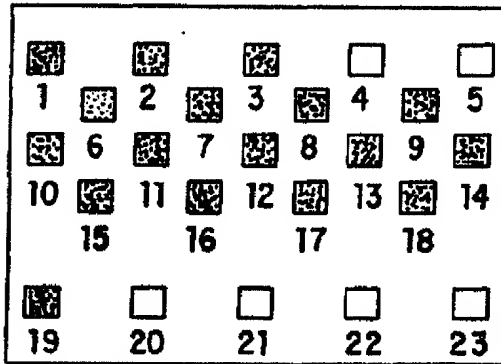
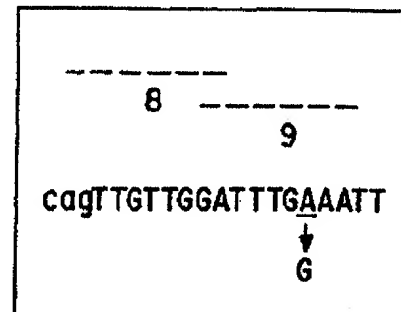
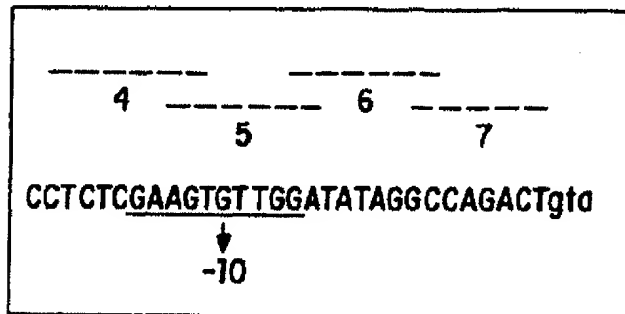
FIG. 4

【図5】

エキソン 7/8 標的



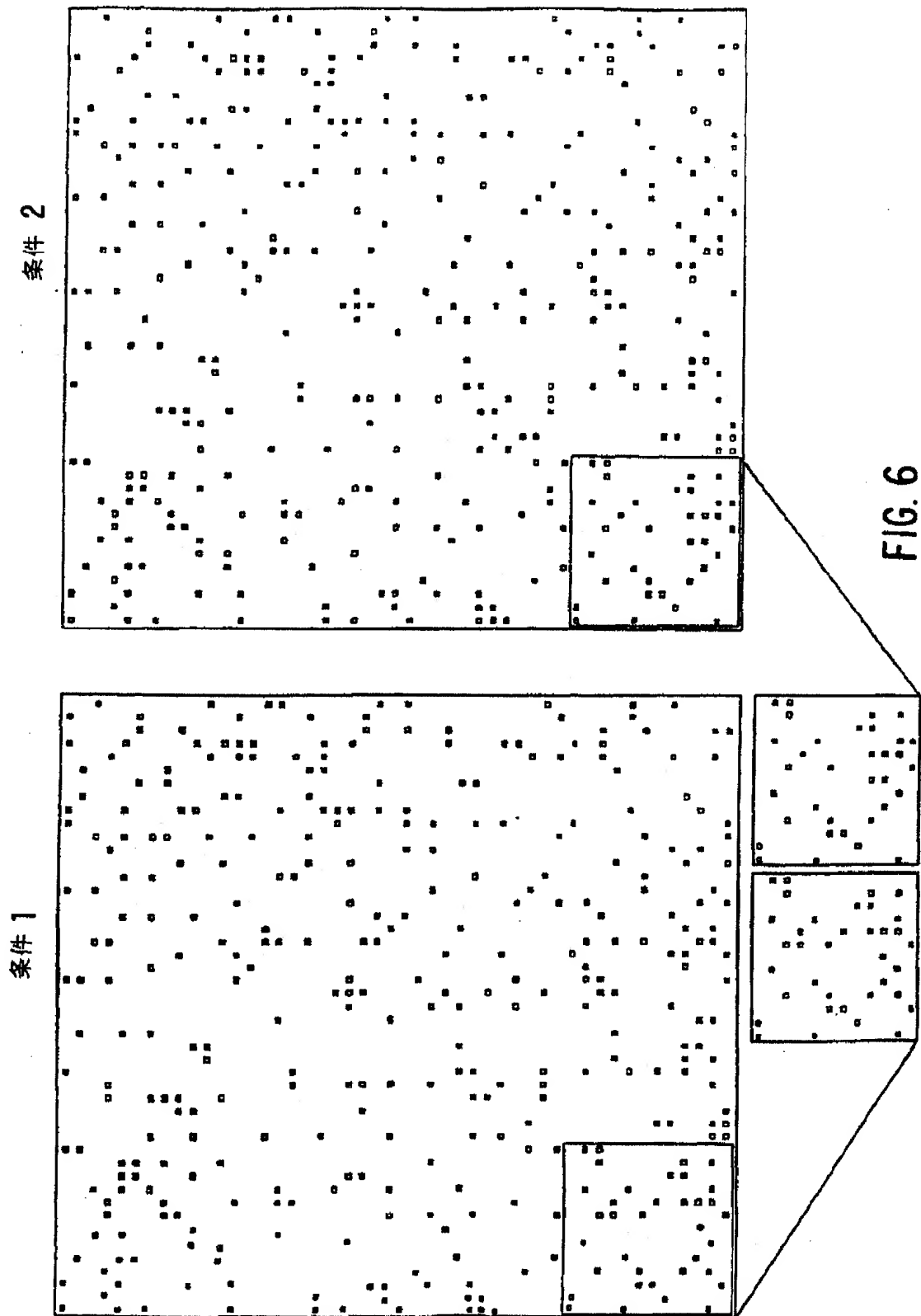
2塩基で重複する、8重体-10重体集団



「突然変異」ハイブリダイゼーション・パターン

FIG. 5

【図6】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Appl. No.
PCT/US 94/12282

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 B01L3/00 C07K1/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 B01L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, A, 0 347 579 (MESSERSCHMITT-BÖLKOW-BLOHM GMBH) 27 December 1989 see column 3, line 50 - column 4, line 31; figure 6 ---	1, 8, 14, 17, 18
A	SCIENCE, vol. 258, 30 October 1992, LANCASTER, PA US pages 783 - 785 TONUCCI ET AL. 'Nanochannel Array Glass' cited in the application ---	1, 3, 14, 17, 18
A	CLINICAL CHEMISTRY, vol. 39, no. 4, 1993, WINSTON US pages 719 - 722 BEATTIE ET AL. 'Genosensor Technology' cited in the application see page 720, right column - page 721, left column ---	1-8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 20
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 February 1995		03. 03. 95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bindon, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. onal Application No
 PCT/US 94/12282

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE,A,38 01 987 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 27 July 1989 see the whole document ---	1,3,8, 14,17,18
A	WO,A,89 10977 (ISIS INNOVATION LTD) 16 November 1989 cited in the application see page 11, line 10 - page 13, line 8 ---	1-3,14, 17
A	EP,A,0 505 632 (CARTER-WALLACE INC) 30 September 1992 see column 5, line 6 - line 31; figure 3 see column 7, line 13 - column 8, line 9 ---	1,14,17
A	US,A,5 188 733 (WANG ET AL.) 23 February 1993 see the whole document ---	1,2,14, 17
A	SENSORS AND ACTUATORS A. vol.A21-A23, 1990, LAUSANNE CH pages 904 - 907 KITILSLAND 'A Sub-micron Particle Filter in Silicon' see abstract -----	8,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 Int. onal Application No
PCT/US 94/12282

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0347579	27-12-89	DE-A- 3818614	07-12-89
		DE-A- 3825907	01-02-90
		DE-D- 58907327	05-05-94
		US-A- 5252294	12-10-93
		DE-U- 8817007	02-10-91
DE-A-3801987	27-07-89	AU-A- 2857289	27-07-89
		EP-A, B 0325970	02-08-89
		ES-T- 2054884	16-08-94
		JP-A- 2001499	05-01-90
		JP-B- 6031310	27-04-94
WO-A-8910977	16-11-89	AT-T- 110790	15-09-94
		DE-D- 68917879	06-10-94
		DE-T- 68917879	05-01-95
		EP-A- 0373203	20-06-90
		JP-T- 3505157	14-11-91
EP-A-0505632	30-09-92	NONE	
US-A-5188733	23-02-93	NONE	

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	
G 0 1 N 33/543	5 2 5	0276-2 J	G 0 1 N 33/543	5 2 5 C
33/566		0276-2 J	33/566	
// C 1 2 N 15/09		9162-4 B	C 1 2 N 15/00	A